

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 103**

51 Int. Cl.:

**A61L 15/32** (2006.01)

**A61L 27/24** (2006.01)

**A61K 8/65** (2006.01)

**A61Q 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11194805 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2468307**

54 Título: **Matrices de colágeno biocompatibles estabilizadas frente a la degradación**

30 Prioridad:

**23.12.2010 EP 10196934**

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

**14.08.2015**

73 Titular/es:

**MEDSKIN SOLUTIONS DR. SUWELACK AG  
(100.0%)**

**Josef-Suwelack-Strasse  
48727 Billerbeck, DE**

72 Inventor/es:

**MALESSA, RALF y  
KASSNER, ANJA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 543 103 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

Matrices de colágeno biocompatibles estabilizadas frente a la degradación

5 **Introducción y estado de la técnica**

La presente invención se refiere a matrices de colágeno biocompatibles, estabilizadas frente a la degradación, que además de fibras de colágeno insolubles presentan en particular un porcentaje de constituyentes peptídicos y de colágeno solubles, a un procedimiento para la producción de tales matrices de colágeno, que comprenden en particular la reticulación química con un agente de reticulación epoxifuncional, así como al uso de las matrices de colágeno de acuerdo con la invención como agente cosmético o farmacéutico, en particular para la aplicación tópica así como agente para la cicatrización, como implante o como agente para la hemostasia en seres humanos o animales, así como estructura de soporte para la colonización celular en el campo de la biotecnología, investigación pura y la ingeniería de tejidos.

En el campo de los materiales de colágeno tiene una gran importancia la provisión de materiales mecánicamente estables, flexibles, con estabilidad suficiente contra descomposición biológica (Degradación), y estructuras de soporte ("armazones"). En particular en el campo del tratamiento de vidas de los implantes biológicos así como en el campo de la ingeniería de tejidos y de la colonización celular de estructuras de soporte, pero también en el campo de materiales altamente absorbentes en el campo de la cicatrización y la hemostasia, cobran cada vez más importancia tales requisitos en cuanto al producto, en el campo cosmético se desean a este respecto adicionalmente en particular una háptica y óptica agradables, con una compatibilidad con la piel alta al mismo tiempo, además también la provisión de principios activos a través de tales materiales de soporte o de base estabilizados frente a la degradación, que además disponen de una alta estabilidad mecánica, tanto en la aplicación cosmética como en la aplicación farmacéutica así como en la ingeniería de tejidos representa un aspecto importante. La combinación de por ejemplo "armazones" (estructuras) de la ingeniería de tejidos con principios activos es una estrategia que se refleja en numerosas publicaciones. Los principios activos, que se unen de manera adsorptiva o covalente al "armazón" o se liberan de manera continua a partir de un depósito, despliegan su actividad biológica a lo largo del mayor periodo de tiempo, pertenecen al estado de la técnica. La liberación continua desde un depósito de principios activos correspondiente abre en particular, en el cambio de principios activos que tienen una semivida biológica corta, intervenciones dirigidas en la cicatrización. De este modo a través de la expresión génica se influye en muchos fenómenos críticos, por ejemplo la diferenciación celular, la proliferación celular y agregación celular, mediante proteínas señal, la disponibilidad, diferenciación, la regeneración o la sustitución de células individuales, la división celular y regulación representan objetivos de investigación principales (Rui Miguel Paz, Dissertation RWTH Aachen, 2004). El equipamiento de biomateriales con sustancias biológicamente activas para mejorar la funcionalidad ilustra el desarrollo del material de implante puramente pasivo hasta el implante activo, que interacciona de manera dirigida con el tejido circundante o el líquido de tejido. Las combinaciones de sustancias biológicamente activas con biomateriales están muy extendidas en la medicina y desempeñan un papel cada vez más por ejemplo, en la evitación de infecciones debidas a implantes. De este modo en el campo de los apósitos para heridas desempeña cada vez un papel más importante un medio de cicatrización mejorado, una reducción de infecciones así como la estimulación del crecimiento celular mediante adición de principios activos pero también la influencia orientada de la diferenciación celular y del patrón de expresión de las células a través de la adaptación controlable de las propiedades de materiales físicas, tal como en particular la rigidez del material de matriz, también el denominado tratamiento de exudado de heridas, que se refiere en particular en el caso de heridas crónicas a la influencia e interacción en heridas que exudan, es decir húmedas, tanto en el plano físico a través de funciones puramente adsorptivas, drenaje del exudado de herida etc., como también en el plano farmacológico, liberación de principios activos ha cobrado cada vez más importancia en los últimos años.

La carga de matrices de colágeno con principios activos de proteína, tal como factores de crecimiento se conoce desde hace mucho tiempo y se describe por ejemplo en el documento WO 85/04413 o en el documento US 5219576 (EP 0428541 B1).

Sin embargo para poder alcanzar también los requisitos de producto en cuanto a una alta estabilidad mecánica los materiales de soporte así como una reducción de una descomposición o degradación biológica rápida, por ejemplo de una herida o en el caso de implantes en el cuerpo, se conoce el método de la reticulación, en particular la reticulación con agentes de reticulación químicos y está muy extendido. En particular se conoce también efectuar una reticulación química de colágeno con agentes de reticulación epoxifuncionales.

A este respecto se conocen particularmente procedimientos en los que la reticulación con el reticulante de epoxi tienen lugar en un material de colágeno sólido, secado, por regla general un material de colágeno liofilizado. De este modo por ejemplo el documento DE 69533285 describe prótesis de menisco de fibras de biopolímero que pueden estar reticuladas químicamente o parcialmente reticuladas químicamente, teniendo lugar la reticulación en las fibras de colágeno ya liofilizadas.

También el documento WO 2003/053490 A1 (EP 1455855 A1) tiene como objeto materiales de colágeno liofilizados, que pueden reticularse químicamente, también la reticulación química de materiales de colágeno-elastina liofilizados

se describe en este documento, usándose como agente de reticulación química glutaraldehído, y mencionándose epóxidos únicamente en general como agentes de reticulación.

5 El documento DE 102006006461 A1 y el documento DE 102004039537 A1 tienen como objeto matrices de colágeno colonizadas con células principales (modelos de células completas), en las que los materiales de colágeno colonizados se someten a una reticulación química con glutaraldehído. Numerosos agentes de reticulación químicos adicionales se exponen únicamente de manera general. También en este caso se describe únicamente una reticulación de los materiales ya liofilizados.

10 En el caso de este procedimiento la reticulación química tiene lugar habitualmente mediante impregnación de los materiales de colágeno sólidos en particular aquellos en forma de hojas o capas, con una solución del agente de reticulación. Los materiales de colágeno sólidos en forma de capa o de hoja (*Layer*) se obtienen a este respecto por  
 15 regla general en primer lugar mediante secado (por ejemplo liofilización) de materiales de colágeno de acuerdo con procedimientos habituales y después de la impregnación con el agente de reticulación se someten a una nueva etapa de secado (por ejemplo una nueva liofilización. Por regla general a este respecto en una etapa adicional se separa mediante lavado el agente de reticulación no acoplado después de tener lugar la reacción de reticulación mediante lavado intensivo a partir del material, lo que es necesario con respecto a la biocompatibilidad o la reducción de la toxicidad compuesta por restos de agente de reticulación del material reticulado,

20 Un procedimiento correspondiente se describe en particular en "Cross-linking of Collagen-based materials" (Dissertation R. Zeeman, 1998) así como por Zeeman *et al*, in J Biomed Mater Res, 46, 424-433, 1999, in J Biomed Mater Res, 47, 270-277, 1999, en Biomaterials, 20, 921 -931, 1999, así como en J Biomed Mater Res, 51, 541-548, 2000, en estos documentos por ejemplo, colágeno de oveja dérmico en forma de capa obtenido mediante liofilización, denominado "dermal sheep collagen" (DSC-layer) en pH ácido o alcalino con una solución de un agente  
 25 de reticulación epoxifuncional tal como 1,4 butanodiolglicidil éter (BDDGE) y se reticula a temperatura ambiente (20 - 30 °C) a lo largo de un periodo de tiempo de varios días. A continuación se lavan las capas de colágeno completamente reticuladas y se liofilizan de nuevo, para obtener los materiales de colágeno reticulados con epoxi. En otras publicaciones se describe que el valor de pH usado para la reticulación tiene una influencia considerable sobre la flexibilidad y elasticidad del material reticulado, mostrando materiales, que se reticularon a un valor de pH  
 30 ácido < de 6 (pH 4-6) una mayor flexibilidad y elasticidad con respecto a los materiales reticulados en el alcalino,

También el documento EP 0898973 B1 describe procedimientos para la reticulación química de colágeno. Como posible material de partida para la reticulación química se menciona en este caso en principio también una suspensión de colágeno. A este respecto el procedimiento de reticulación descrito consiste sin embargo  
 35 esencialmente en al menos dos etapas de reticulación y se lleva a cabo por regla general a valores de pH de 4-9. El único ejemplo de realización concreto en el que tiene lugar una reticulación con reticulantes de epóxido tal como BDDGE se refiere a colágeno de oveja dérmico en forma de hoja (DSC), tal como se describió anteriormente, que se impregna con solución de BDDGE y después de un tiempo de reacción de 7 días se lava y se liofiliza de nuevo.

40 En tales procedimientos, en los que la reticulación tiene lugar mediante impregnación de un material de colágeno sólido, secado (liofilizado) y posterior secado de nuevo, es desventajosa por un lado la necesidad de la realización de varias etapas de secado, lo que es desventajoso en particular por motivos económicos de procedimiento, así como, por otro lado, el alto tiempo empleado que está relacionado en particular con los tiempos de reticulación que transcurren a lo largo de varios días, también se muestra que en el caso de esta nueva realización de una liofilización de un material reticulado, ya liofilizado, puede observarse un cambio de material indeseado, en particular  
 45 en forma de una contracción del material en forma de capas. Mediante la elevada carga térmica del material de colágeno, que se debe inevitablemente al segundo proceso de secado adicional, ha de contarse además con efectos desventajosos con efectos desventajosos sobre la estructura del material de colágeno, tal como por ejemplo una elevada desnaturalización u otros cambios estructurales en la estructura peptídica de colágeno, en particular en  
 50 materiales de colágeno en los que el colágeno se encuentra como proteína estructural nativa, biológica.

Por el contrario por ejemplo por el documento EP 0793511 A1 se conoce un procedimiento para la producción de espumas de biopolímero compuestas, que comprenden entre otros, también mezclas de polímero de colágeno y elastina, en el que tiene lugar la adición del agente de reticulación a una suspensión de polímero, y solo al concluir  
 55 tiene lugar la realización de una única etapa de secado, en particular una liofilización. Una reticulación de tales mezclas de polímero con reticulantes epoxifuncionales sin embargo no se da a conocer a este respecto.

También en el documento EP 0680990 A1 se describe la adición del agente de reticulación a una suspensión de polímero, sometiéndose en este caso mezclas de polímero de colágeno y un polímero hidrófilo sintético, tal como en  
 60 particular un polímero hidrófilo sintético funcionalmente activado tal como por ejemplo un glicol preferentemente un polietilenglicol activado difuncionalmente (PEG) a la reacción de reticulación. Epóxido como agente de reticulación se enumera únicamente de forma general como un posible entre numerosos agentes de reticulación.

El documento US 4.883.864 describe composiciones de colágeno modificadas químicamente (reticuladas), tratándose en este caso de colágeno que se ha hecho soluble por medio de pepsina, que se reticula a continuación mediante adición del agente de reticulación. Epóxido se menciona en este documento así mismo únicamente de

forma general como un posible agente de reticulación. El ejemplo de realización 18 menciona que los materiales de colágeno de acuerdo con la invención pueden liofilizarse y usarse como material de esponja quirúrgica. El uso de colágeno nativo no soluble o el uso concreto de epóxido, en particular en relación con la etapa de la liofilización tampoco se da a conocer en este documento.

5 Por el documento DE 10350654 A1, de una solicitud de patente más antigua de la solicitante, se conocen ya materiales de colágeno reticulados químicamente, en particular aquellos a partir de colágeno nativo insoluble en ácido. En el mismo se utilizan preferentemente suspensiones de colágeno acuosas con un valor de pH de 2-4. Además se menciona la posibilidad de la adición de agentes de reticulación a tales suspensiones de colágeno  
10 acuosas y posterior liofilización, además se menciona que en particular, en el caso del uso de agentes de reticulación que reaccionan en ácidos, puede tener lugar el tratamiento de reticulación antes de la liofilización. Como posibles agentes de reticulación se enumeran distintos grupos de agentes de reticulación polifuncionales, incluyendo esta enumeración general también diepóxidos tal como 1,4-butanodioldiglicidil éter (BDDGE). Sin embargo preferentemente se lleva a cabo una reticulación deshidrotérmica. Para materiales que están reticulados por medio  
15 de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), se menciona además la mejora sorprendente de las propiedades angiogénicas del material de colágeno en relación con la reticulación deshidrotérmica destacada como preferente se mencionan temperaturas de liofilización de al menos 50 a 180 °C destacándose para la reticulación deshidrotérmica temperaturas superiores por encima de 80 °C. Una elección concreta de epóxido como agentes de reticulación en particular en combinación con una realización de procedimiento concreta, tiene en cuenta  
20 por ejemplo un valor de pH concreto < de 4 y un intervalo de temperatura de liofilización seleccionado, no se desprende sin embargo de ello. En este documento se describe además el procesamiento y la producción de una suspensión de colágeno a partir de colágeno nativo insoluble en forma de fibras. A este respecto no resulta sin embargo ninguna indicación sobre como obtener de manera liberable en el material de colágeno el contexto de este procesamiento constituyentes peptídicos de colágeno solubles en ácido que se producen presumiblemente. En  
25 particular en relación con la reticulación química mencionada únicamente de forma general no se menciona la necesidad de la obtención de tales constituyentes solubles ni una posibilidad para ello. Al contrario este documento remite explícitamente al uso deseado de material de colágeno insoluble en ácido y colágeno soluble en ácido se denomina explícitamente como desventajoso, la presentación por ejemplo de principios activos proteinógenos (factores de crecimiento etc. se consigue en este caso a través de una encapsulación e incorporación de  
30 microesferas.

Se denomina colágeno insoluble en ácido nativo habitualmente la fracción de una suspensión de colágeno insoluble en solución ácida, precipitable mediante centrifugación, que contiene fibras visibles a microscopio óptico, en el  
35 sentido de la presente invención colágeno insoluble en ácido nativo comprende en particular la fracción insoluble en solución ácida de pH < 4, precipitable mediante centrifugación a 16.000 g, de una suspensión de colágeno, que contiene fibras, que pueden verse en el microscopio óptico (densidad de fibras a partir de 0,2 µm).

Por el contrario se denomina colágeno soluble nativo o soluble en ácido el porcentaje de colágeno que forma en  
40 solución ácida a pH 4 una solución clara, que no incluye ninguna estructura de fibras reconocible bajo el microscopio óptico.

El colágeno soluble nativo o soluble en ácido puede separarse mediante fraccionamiento, por ejemplo por medio de procedimientos conocidos de SEC (Size-Exclusion-Chromatographie), en moléculas de colágeno de mayor peso  
45 molecular, nativas, completas con un peso molecular > que 250 kDa y péptidos de colágeno de bajo peso molecular con un peso molecular < 250 kDa. A este respecto pueden asociarse los péptidos de colágeno de bajo peso molecular a ninguna molécula de colágeno completa.

En principio la existencia de moléculas de colágeno completas solubles así como los constituyentes peptídicos de bajo peso molecular puede detectarse cualitativamente mediante análisis de los constituyentes solubles por medio  
50 de métodos conocidos, por ejemplo SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Dodecil Sulfato de Sodio-Poliacrilamida / Electroforesis en Gel de Docecil sulfato de sodio-poliacrilamida), tal como se representa en los siguientes ejemplos.

Los constituyentes de colágeno solubles en ácido y los péptidos de colágeno presentan distintos efectos ventajosos. Así, disponen de propiedades formadoras de película y pueden reducir, con la aplicación tópica o liberación a partir  
55 de un material de soporte sobre la piel a través de esta formación de película, el comportamiento de retención de agua de la piel mejorar y reducir correspondientemente la pérdida de agua transepidérmica. Además los fragmentos de colágeno solubles representan importantes sustancias mensajeras de señal y constituyentes de matriz, que provocan propiedades positivas en la cicatrización así como en la capacidad de control de la colonización celular/reacción celular, lo que es ventajoso y deseado en el campo de la ingeniería de tejidos con respecto a  
60 denominado perfil de expresión de la colonización celular. Por lo tanto un aspecto importante de la presente invención se basa en obtener tales constituyentes de colágeno solubles en ácido y péptidos así como otros constituyentes peptídicos en la matriz de colágeno liofilizada, estabilizada frente a la degradación (reticulada químicamente), de modo que estos pueden liberarse con la aplicación de la matriz y pueden conseguir en el sitio de aplicación su efecto ventajoso.  
65

Los materiales de colágeno reticulados químicamente y estabilizados frente a la degradación conocidos por el

estado de la técnica contienen las fracciones, fragmentos de colágeno solubles en ácido y otros constituyentes peptídicos o bien debido a la naturaleza del material fundamental, por ejemplo en el caso de las capas de colágeno de piel dividida o las capas de colágeno de oveja dérmico descritas anteriormente (DSC), o debido al procedimiento de reticulación de epóxido llevado a cabo y las condiciones de reticulación empleadas a este respecto. Los procedimientos de reticulación de epóxido descritos en el estado de la técnica se llevan a cabo con el uso de un exceso claro de agente de reticulación en un porcentaje en volumen elevado de disolvente a lo largo de un largo periodo de tiempo de al menos 72 horas. Las fracciones posiblemente presentes solubles en el material bruto, se liberan a este respecto por el alto porcentaje de disolvente, y por lo tanto se separan mediante lavado. Mediante el alto efecto de dilución porcentajes de colágeno y peptídico soluble están presentes solo ligeramente en el material. Los constituyentes de colágeno y peptídicos solubles aún presentes en pequeña medida, se reticula mediante las altas concentraciones de agente de reticulación y los largos tiempo de reticulación con las hebras de colágeno y con ello se unen de manera no separable en el material reticulado. Dado que los procedimientos descritos comprenden además como etapa obligatoria la separación por lavado del agente de reticulación a partir del material reticulado, se separan mediante lavado a más tardar con esta etapa de lavado posiblemente reacciones de colágeno solubles a un no unidas o fragmentos de colágeno u otros constituyentes peptídicos solubles de bajo peso molecular a partir del material reticulado. Por lo tanto a partir del estado de la técnica no se encuentra disponible ningún material de colágeno reticulado químicamente que al mismo tiempo, además de una alta estabilidad frente a la degradación y estabilidad mecánica debido a la reticulación química, disponga también de una alta biocompatibilidad (bajo toxicidad), así como fragmentos, fracciones de colágeno solubles en ácido liberables mediante el material reticulado y/o constituyente peptídicos.

### Planteamiento

El objetivo de la presente invención se basará por lo tanto en proporcionar matrices de colágeno liofilizadas, que presenten tanto una alta estabilidad frente a la descomposición biológica (estabilidad frente a la degradación, estabilidad frente a la hidrólisis) como que dispongan de una resistencia al desgaste mecánica adecuada para aplicaciones cosméticas y médicas, en particular en estado hidratado (resistencia a la rotura por tracción en húmedo). Además las matrices de colágeno dispondrán de una alta biocompatibilidad, caracterizada por una baja toxicidad, así como permiten la liberación de constituyentes peptídicos y de colágeno solubles a partir de la matriz reticulada durante la aplicación. Además debe darse una alta capacidad de absorción de líquido y velocidad de humectación de las matrices de colágeno reticuladas, y las matrices de colágeno dispondrán de una alta flexibilidad y elasticidad así como de propiedades hápticas y ópticas agradables (por ejemplo alta densidad óptica), para ser adecuadas especialmente como agentes cosméticos o farmacéuticos, en especial para el uso como recubrimientos o máscaras cosméticas así como agentes de cicatrización, implante o agente de hemostasia así como estructuras de soporte para la colonización celular/cultivo celular en la ingeniería de tejidos. En un aspecto adicional se proporcionarán matrices de colágeno, que mediante una adaptación contra la resistencia permiten una influencia dirigida de la diferenciación celular y del patrón de expresión de las células en el campo de la biotecnología, la investigación pura y la ingeniería de tejidos. Una estructura de soporte estable y optimizada con respecto a la influencia del patrón de expresión de células y alta biocompatibilidad del material de colágeno es una condición para el crecimiento facilitado de nuevas células y su comportamiento, por ejemplo en el caso del uso como implante así como en el caso del uso como estructura de soporte celular en la ingeniería de tejidos.

No en último lugar, el procedimiento será superior en comparación con el estado de la técnica desde el punto de vista económico.

### Descripción de la invención

Los inventores encontraron que un material de colágeno mejorado específico de este tipo, puede obtenerse agregándose a una suspensión acuosa de colágeno, que comprende además de colágeno nativo insoluble en ácido en forma de fibras también fracciones de colágeno soluble nativo (soluble en ácido) y péptidos de colágeno, tal como se definió anteriormente, y/o formadores de estructura o principios activos del grupo de las proteínas de matriz, constituyentes de matriz extracelulares, principios activos proteinógenos y constituyentes peptídicos o proteicos solubles, a un valor de pH < 4, un agente de reticulación epoxifuncional, congelándose esta mezcla a continuación y liofilizándose a una temperatura < 100 °C. En particular se mostró sorprendentemente que mediante este nuevo procedimiento podía reducirse drásticamente el contenido de agente de reticulación de epóxido con respecto a los contenidos de reticulante conocidos por el estado de la técnica, sin obtener pérdidas en el grado de reticulación. Un valor de pH más bajo < 4 así como contenidos de agente de reticulación reducidos son ventajosos a este respecto en particular con respecto a la actividad residual de epóxido después de la liofilización y la obtención de los constituyentes peptídicos y de colágeno no reticulados, solubles que pueden liberarse en la aplicación y por lo tanto con respecto a la toxicidad y biocompatibilidad del material de colágeno reticulado. Temperaturas de liofilización menores que aquellas que se emplean habitualmente en una reticulación deshidrotérmica, pueden ser ventajosas por un lado desde puntos de vista económicos, en particular son esenciales sin embargo de manera conocida para un procesamiento cuidadoso y la protección de sustancias contenidas sensibles a la temperatura (por ejemplo principios activos inestables). Una ventaja adicional del procedimiento de acuerdo con la invención se basa en la aplicación de un denominado procedimiento de un solo recipiente mediante adición del reticulante a la suspensión de colágeno y posterior liofilización directa para dar el producto final reticulado con un menor tiempo de permanencia

(periodo de aplicación) de la mezcla de colágeno-reticulante de preferentemente como máximo 24 horas antes de la liofilización final. De esta manera es posible en conjunto una realización de procedimiento claramente más económica.

5 De esta manera puedo resolverse en particular el planteamiento anterior mediante la previsión de un procedimiento para la producción de matrices de colágeno reticuladas con epoxi biocompatibles estables mecánicamente y estabilizadas frente a la degradación, que contienen constituyentes de colágeno y peptídicos solubles que pueden liberarse en la aplicación, comprendiendo el procedimiento las etapas:

- 10 a) producir una suspensión de colágeno acuosa  
 b) ajustar el valor de pH de la suspensión de colágeno de la etapa a) a  $\text{pH} < 4$ ,  
 c) opcionalmente agregar otros formadores de estructura, principios activos y/o sustancias auxiliares,  
 d) agregar un agente de reticulación epoxifuncional siendo variable el orden de las etapas c) y d),  
 e) congelar la mezcla de colágeno que puede obtenerse de la etapa d),  
 15 f) liofilizar la mezcla congelada de la etapa e) a una temperatura de liofilización  $< 100\text{ }^{\circ}\text{C}$   
 g) ajustar opcionalmente el material de colágeno reticulado liofilizado que puede obtenerse de este modo a un contenido de humedad de  $< \text{el } 25\%$  en peso, con respecto al material de colágeno liofilizado y  
 h) opcionalmente transferir los materiales que pueden obtenerse de la etapa g) al molde deseado, esterilizar y/o confeccionar.

20 Además son objeto de la presente invención también las matrices de colágeno biocompatibles, reticuladas, estabilizadas frente a la degradación y estables mecánicamente que pueden obtenerse de acuerdo con este procedimiento, que contienen constituyentes peptídicos y de colágeno solubles que pueden liberarse en la aplicación, no reticulados.

25 El colágeno usado de acuerdo con la invención para la producción de las matrices de colágeno reticuladas, es en particular de origen bovino, porcino, equino, humano o se trata de colágeno producido mediante ingeniería genética. De manera especialmente preferente se trata de colágeno de origen bovino. La producción de un colágeno especialmente preferido se describe en el documento DE 4048622 A1 y en el documento DE 1 0350654 A1 de la solicitante. El procedimiento descrito en esos documentos para la producción de esponjas de colágeno incluye:

- 30 - someter a un material bruto de colágeno a un tratamiento con álcali,  
 - lavar el material de colágeno resultante,  
 - someter el colágeno resultante a un tratamiento con ácido,  
 35 - lavar el material de colágeno resultante, y  
 - triturar el material de colágeno resultante en particular con un molino coloidal,

pudiendo repetirse varias veces cada una de las etapas mencionadas, dado el caso.

40 A este respecto se obtiene una suspensión de colágeno acuosa del denominado colágeno insoluble en ácido nativo en forma de fibras y fibrillas, que comprende además porcentajes medibles de colágeno soluble en ácido y constituyentes peptídicos solubles en ácido. La detección cualitativa de tales porcentajes solubles en ácido puede tener lugar por ejemplo por medio de SDS-PAGE tal como se describe en el presente documento. Esta suspensión de colágeno puede procesarse entonces con el procedimiento de acuerdo con la invención mediante el ajuste del  
 45 valor de pH a  $\text{pH} < 4$ , opcionalmente adición de otros formadores de estructura, principios activos cosméticos o farmacéuticos así como sustancias auxiliares y posterior adición del agente de reticulación epoxifuncional mediante liofilización a una temperatura de liofilización  $< 100\text{ }^{\circ}\text{C}$  para dar el producto de acuerdo con la invención.

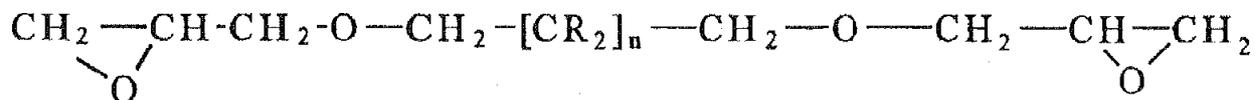
50 El uso de un material de colágeno soluble en ácido exclusivamente, tal como se describe repetidas veces en el estado de la técnica (véase por ejemplo el documento US 4.883.864) es desventajoso con respecto a las suspensiones de colágeno usadas en el procedimiento de acuerdo con la invención con un porcentaje principal de colágeno insoluble en ácido en forma de fibras y fibrillas, dado que en comparación en el caso de colágeno soluble en ácido exclusivamente son necesarias cantidades claramente mayores de agente de reticulación, para conseguir un grado de reticulación suficiente. Se conoce que materiales producidos a partir de colágeno puramente soluble en  
 55 ácido per se en estado unido presentan una estabilidad mecánica insuficiente (resistencia a la rotura por tracción en húmedo) y baja estabilidad frente a la degradación con respecto a aquellos que pueden obtenerse a partir de colágeno insoluble en ácido. Esto puede atribuirse esencialmente a que el colágeno soluble en ácido se compone de moléculas de colágeno individualizadas, mientras que el colágeno insoluble en ácido se compone esencialmente de fibrillas de colágeno, que están construidas por molécula de colágeno ya naturalmente reticuladas entre sí  
 60 dispuestas lateralmente. Estas fibrillas están unidas a su vez a través de reticulación natural lateralmente para dar agregados mayores, las fibras de colágeno. Una degradación tanto de fibras de colágeno ya naturalmente reticuladas como reticuladas químicamente tienen lugar de manera claramente ralentizada debido a la pequeña superficie relativa y capacidad de ataque de cadenas de proteína individuales en el material compuesto de fibras.

65



con  $x + z = 0 - 70$  e  $y = 0 - 90$ .

Por el grupo de los diepóxidos están comprendidos en particular aquellos que corresponden a la fórmula general



en la que R puede ser cualquier sustituyente que no interfiera con el proceso de reticulación y/o produzca la solubilidad en agua de la sustancia de reticulación en solución acuosa y en la que  $n = 1 - 6$ , preferentemente  $n = 1 - 4$ .

En principio las propiedades determinantes de las matrices de colágeno de acuerdo con la invención pueden controlarse mediante la dirección del agente de reticulación de epóxido adecuado, por ejemplo con respecto a su bifuncionalidad, longitud de cadena, etc.

Preferentemente se seleccionan agentes de reticulación de epóxido solubles en agua, de manera especialmente preferida el agente de reticulación de epóxido se selecciona del grupo de los diepóxidos, prefiriéndose muy especialmente 1,4-butanodioldiglicidil éter (BDDGE). Los compuestos de epóxido pueden realizarse bajo condiciones adecuadas tanto reacciones catalizadas por ácido como reacciones catalizadas por base con una pluralidad de grupo funcionales, incluyendo grupos amina carboxilo. En el estado de la técnica (por ejemplo *et al.*) se describe que en la reticulación en el intervalo de pH ácido (pH 4-6) tiene lugar en principio una reticulación de los grupos carboxilo, mientras que en la reticulación alcalina (pH 9) se reticula en principio en los grupos amida.

Para la incorporación del agente de reticulación así como sustancias contenidas adicionales posibles del grupo de los constituyentes peptídicos y proteicos solubles, así como de principios activos y/o sustancias auxiliares, se enfría la suspensión de colágeno preferentemente hasta temperaturas por debajo de temperatura ambiente (23 °C). En particular la adición tiene lugar a una temperatura < 20 °C, preferentemente a una temperatura < 10 °C, de manera especialmente preferente a ≤ 5 °C, no bajándose en cambio en este punto en el desarrollo de procedimiento la temperatura de la suspensión / mezcla de colágeno naturalmente hasta la congelación de la masa.

La suspensión de colágeno acuosa así obtenida, descrita anteriormente, que contiene el agente de reticulación así como opcionalmente otros formadores de estructura, principios activos y sustancias auxiliares (mezcla de colágeno) y presenta un valor de pH < 4, se congela a continuación, preferentemente en el plazo de 24 horas, de modo que el tiempo de permanencia (vida útil) de la mezcla de colágeno acuosa no supere en la medida de lo posible 24 horas.

La temperatura preferida de la mezcla de colágeno acuosa durante estos tiempos de permanencia (periodos de aplicación) corresponde a las temperaturas reducidas definidas anteriormente del proceso de adición y de manera correspondiente la mezcla de colágeno se mantiene durante posibles tiempos de permanencia a una temperatura > 20 °C, preferentemente < 10 °C, de manera especialmente preferente ≤ 5 °C, sin que se congele la mezcla de colágeno.

Las temperaturas reducidas durante la adición y los tiempos de permanencia de la mezcla de colágeno antes de la congelación repercuten sorprendentemente de manera ventajosa sobre la estabilidad mecánica (resistencia a la rotura por tracción en número) de las matrices de colágeno liofilizadas de acuerdo con la invención. De este modo se mostró sorprendentemente, que con una disminución de la temperatura durante el tiempo de permanencia puede conseguirse una mejora de la resistencia a la rotura por tracción en número mecánica.

Preferentemente, la congelación posterior tiene lugar a lo largo de un periodo de tiempo de 0,5 a 4 horas, preferentemente de 1 a 3 horas a una temperatura de -10 a -60 °C.

Sorprendentemente se encontró que tiempos de permanencia más largos de varios días, tal como se describe en el estado de la técnica, evidentemente no son obligatoriamente necesarios para conseguir una reticulación completa y satisfactoria. Por el contrario, se mostró sorprendentemente que en el proceso de acuerdo con la invención tiempos de permanencia más largos antes de la congelación repercuten desventajosamente sobre el grado de reticulación y por lo tanto sobre la resistencia a rotura por tracción (resistencia a la rotura por tracción en número) y en la tasa de degradación. En este sentido se descubrió que era ventajoso, en el procedimiento de acuerdo con la invención, congelar la mezcla de colágeno acuosa directamente después de la producción, en el plazo de como máximo 24 horas, más preferentemente en el plazo de como máximo 18 horas, de manera especialmente preferente en el plazo de menos de 12 horas. Además de los efectos ventajosos con respecto a las propiedades de material se prefieren cortos tiempos de permanencia también por motivos económicos de procedimiento.

Se supone que mediante la congelación directa de la suspensión acuosa se impide la reacción de reticulación entre las moléculas peptídicas y las moléculas de agente de reticulación en la mezcla acuosa, lo que es ventajoso debido a la siguiente teoría representada a continuación con respecto al mecanismo de reacción que transcurre:

En el caso de la emisión del agente de reticulación epoxifuncional a la suspensión de colágeno acuosa transcurre en principio una reacción de concurrencia entre hidrólisis-epóxido (epóxido  $\rightleftharpoons$  H<sub>2</sub>O por un lado y reacción de reticulación entre epóxido y proteína (epóxido  $\rightleftharpoons$  proteína) por otro lado. Mediante la congelación inmediata se inmoviliza los constituyentes de reacción y las reacciones casi “se congelan”. Además a este respecto el agua se congela en forma pura y empuja los constituyentes disueltos (epóxido) a la periferia de los cristales de H<sub>2</sub>O, mediante lo cual el epóxido se localiza de manera concentrada en proximidad relativa a las proteínas que van a reticularse. Mediante esta proximidad relativa generada y concentración elevada del epóxido a las proteínas, resulta supuestamente una genética de reacción ventajosa con las fibras de colágeno y la reacción de concurrencia se desplaza en la dirección “epóxido  $\rightleftharpoons$  proteína”. Se supone además con el comienzo del proceso de liofilización a través del aporte de energía que tiene lugar a este respecto, mediante el cual las moléculas de agua congeladas se pasan mediante sublimación directamente al estado gaseoso, también se proporciona la energía de activación para la reacción de epóxido  $\rightleftharpoons$  proteína, mediante la cual ésta se pone en marcha. Dado que, además que el agua mediante la sublimación ya no llega al estado intermedio de la fase líquida, se impide además la reacción de hidrólisis concurrente epóxido  $\rightleftharpoons$  H<sub>2</sub>O.

Por lo tanto se prefiere especialmente de acuerdo con la invención mantener los tiempos de reacción en la suspensión acuosa lo más cortos posibles y pasar la misma de la manera más rápida posible a una forma congelada.

Debido a las realizaciones anteriores es en particular también posible utilizar en el procedimiento de acuerdo con la invención cantidades extremadamente pequeñas del reticulante de epóxido. De acuerdo con la invención se utilizan preferentemente concentraciones de epóxido hasta máximo el 50 % en peso, preferentemente hasta el 20 % en peso, preferentemente hasta el 10 % en peso, de manera especialmente preferente hasta el 7 % en peso, en cada caso con respecto a la masa seca de la suspensión de colágeno o hasta como máximo el 1 % en peso, preferentemente hasta el 0,4 % en peso, más preferentemente hasta el 0,2 % en peso, de manera especialmente preferente hasta el 0,14 % en peso, en cada caso con respecto a la suspensión de colágeno acuosa (que comprende opcionalmente también formadores de estructura adicionales, principios activos y sustancias auxiliares).

Para conseguir un grado de reticulación satisfactorio (resistencia a la rotura por tracción en número / tasa de degradación / estabilidad frente a la hidrólisis) el agente de reticulación se utiliza preferentemente en una cantidad de al menos el 0,5 % en peso, más preferentemente al menos el 1 % en peso, aún más preferentemente al menos el 3 % en peso, en cada caso con respecto a la masa seca de la suspensión de colágeno acuosa o de al menos el 0,01 % en peso, preferentemente al menos el 0,02 % en peso, más preferentemente al menos el 0,06 % en peso, en cada caso con respecto a la suspensión de colágeno acuosa (que comprende opcionalmente también formadores de estructura adicionales, principios activos y sustancias auxiliares). A este respecto, la elección de la concentración de agente de reticulación adecuada depende considerablemente de las propiedades de material deseadas y del campo de aplicación respectivo.

A diferencia de esto en el estado de la técnica se utilizan concentraciones de epóxido superiores en un múltiplo. El uso de tales concentraciones de epóxido menores repercute en particular también de manera especialmente ventajosa en la biocompatibilidad, de manera correspondiente la actividad residual del agente de reticulación de epóxido (y por lo tanto en una toxicidad reducida) en el producto final, y permite además la obtención deseada de constituyentes peptídicos y de colágeno solubles en ácido que pueden liberarse durante la aplicación del producto final.

La actividad residual de epóxido representa debido al potencial tóxico inherente una medida para la biocompatibilidad de las matrices reticuladas. La determinación de la actividad residual de epóxido puede tener lugar por medio de un ensayo de NBP modificado (Nitrobenzyl-Pyridin-Assays) basado en “Detection of Epoxides with 4-(p-Nitrobenzylpyridine)” de Agarwal *et al.* (1979) Bull. Environm. Contam. Toxicol. 23, pág. 825-829, modificado según Zocher *et al.* (2000) "Epoxide hydrolase activity of Streptomyces strains" J. Biotechnol. 17 de febrero; 77(2-3), pág. 287-92, tal como se describe en detalle en ese documento.

La baja actividad residual de epóxido y por lo tanto alta biocompatibilidad de las matrices de colágeno de acuerdo con la invención puede atribuirse supuestamente también al bajo valor de pH de <4 preferido desde el punto de vista técnico de procedimiento, dado que bajos valores de pH en el producto final provocan una rápida hidrólisis del epóxido residual restante, y por lo tanto, aceleran su capacidad de descomposición en el producto final. Este efecto se ve afectado considerablemente también por el contenido de humedad de las matrices de colágeno reticuladas (en el producto final), tal como se expone adicionalmente a continuación.

Además se descubrió sorprendentemente que las concentraciones de epóxido bajas preferidas de acuerdo con la invención tienen una influencia considerable sobre la resistencia a la rotura por tracción, la estabilidad frente a la hidrólisis así como sobre la degradación enzimática (por ejemplo, degradación de colagenasa). Resultados óptimos se obtuvieron en este caso en los intervalos preferidos definidos anteriormente.

La congelación de la suspensión que puede obtenerse de acuerdo con las etapas descritas anteriormente tiene lugar preferentemente en forma de placas, en principio son posibles sin embargo también cualquier otra forma geométrica concebible, natural configuraciones modeladas o formas fisiológicas. El grosor de las placas resultantes puede

ascender a 0,5 a 5,0 cm, preferentemente de 1,0 a 3,0 cm, de manera especialmente preferente de 1,5 a 2,0 cm.

En el caso de las matrices de colágeno que pueden obtenerse de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención se trata de materiales de colágeno porosos mediante lo cual se requiere también su alta capacidad de adsorción o de absorción de humedad y velocidad de humectación. También para la idoneidad de las matrices de colágeno de acuerdo con la invención como estructuras para la colonización celular en la ingeniería de tejidos su porosidad representa una propiedad considerable.

El grado de porosidad de los materiales de colágeno de acuerdo con la invención es a este respecto esencialmente una función de dos parámetros la densidad de material y el tamaño de cristal de hielo. Altos contenidos de sólidos en la suspensión acuosa aumenta la densidad de material en el producto final liofilizado y reduce la superficie de contacto agente de rehidratación/sólido. Altos gradientes de congelación llevan a cristales de hielo pequeños, que llevan a grandes superficies de material internas, lo que a su vez favorece la rehidratación. Bajos gradientes de congelación por el contrario suponen cristales de hielo grandes lo que lleva a su vez a una estructura de material de poro grande en el producto final. Mediante el control de la velocidad de congelación puede influirse de manera controlada por lo tanto en el tamaño de poro de las matrices de colágeno de acuerdo con la invención. Es además posible influir en el tamaño de poro adicionalmente agregando sustancias tensioactivas, lo que sin embargo se prefiere en menor medida.

Las placas obtenidas pueden almacenarse de forma intermedia opcionalmente a -3 °C a -35 °C. Preferentemente se almacenan las placas congeladas durante al menos 24 horas.

Después de la congelación y opcionalmente almacenamiento intermedio las placas llegan a la liofilización.

Sorprendentemente se ha mostrado que en el procedimiento de acuerdo con la invención la temperatura de liofilización no superará los 100 °C, para obtener matrices de colágeno reticuladas con las propiedades óptimas deseadas con respecto a la resistencia a la rotura por tracción mecánica, estabilidad frente a la hidrólisis, biocompatibilidad de manera correspondiente a una reactividad de epóxido baja así como la obtención de constituyentes peptídicos y de colágeno solubles liberables o formadores de estructura liberables o principios activos del grupo de las proteínas de matriz, constituyentes de matriz extracelulares, principios activos proteinógenos y constituyentes peptídicos o proteicos solubles etc. en el producto final así como el aspecto háptico en forma de flexibilidad, elasticidad y blandura del material.

A partir del estado de la técnica se conoce emplear temperaturas de liofilización relativamente altas de 50 a 180 °C y temperaturas preferidas > que 80 °C para obtener una reticulación deshidrotérmica de matrices de colágeno. A este respecto se conoce además que el grado de reticulación y por lo tanto la resistencia a la rotura por tracción aumenta con la temperatura de liofilización. Grados de reticulación especialmente altos se consiguen de acuerdo con el estado de la técnica por ejemplo con temperaturas de liofilización entre 80 y 150 °C o con temperaturas por encima de 110 a 150 °C. De manera correspondiente puede suponerse que mayores temperaturas de liofilización también en relación con el uso de agentes de reticulación llevan a resultados correspondientemente mejores con respecto al grado de reticulación y por lo tanto a la resistencia a la rotura por tracción. Por el contrario se descubrió sin embargo que en el caso del procedimiento de reticulación de epóxido de acuerdo con la invención temperatura de liofilización más altas llevan a resultados peores con respecto a la resistencia a la rotura por tracción (resistencia a la rotura por tracción en húmedo). En particular pudo establecerse también que una reticulación posterior deshidrotérmica a temperaturas > que 100 °C tiene un efecto desventajoso sobre la resistencia a la rotura por tracción en húmedo. Este efecto era sorprendente en el sentido de que el experto habría esperado un efecto aditivo de reticulación química y reticulación deshidrotérmica.

Se supone que la ventaja de las temperaturas de liofilización de acuerdo con la invención de < 100 °C se requiere por la prolongación inherente del proceso de sublimación. Mediante las temperaturas de liofilización comparativamente más bajas es necesario un proceso de sublimación prolongado hasta el secado completo del material, mediante lo cual se proporciona un desarrollo temporal prolongado para la reacción posterior de agente de reticulación y moléculas peptídicas. De manera correspondiente es posible una completación de la reacción de reticulación a través de este proceso de sublimación prolongado, lo que lleva a grados de reticulación más altos, mientras que altas temperaturas de liofilización llegan a una reacción de reticulación acelerada, que entonces sin embargo en el lugar de manera no homogénea e irregular, lo que lleva a productos finales con baja resistencia a la rotura por tracción. De manera correspondiente el procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo con una temperatura de liofilización < 100 °C, es más preferente temperaturas de liofilización < 85 °C, aún más preferente < 80 °C.

Tal como ya se expuso anteriormente temperaturas de liofilización > que 100 °C, tal como son ventajosas para conseguir una reticulación deshidrotérmica satisfactoria, son desventajosas con respecto a la obtención de constituyentes peptídicos y de colágeno solubles liberables y/o formadores de estructura o principios activos del grupo de las proteínas de matriz, constituyentes de matriz extracelulares, principios activos proteinógenos y constituyentes peptídicos o proteicos solubles, dado que estos, por un lado, reticulan conjuntamente y por lo tanto se unen de manera no separable en el material, y por otro lado, a temperaturas demasiado altas puede tener lugar una

desnaturalización por calor indeseada (al menos parcial) de estos constituyentes proteínogenos.

De acuerdo con los procedimientos de reticulación descritos en el estado de la técnica, en los que se emplean temperaturas de liofilización en el intervalo de 20-30 °C, son necesarios antes de la liofilización tiempos de reticulación comparativamente largos de hasta 44 horas o durante varios días (hasta 7 días). Por el contrario en el procedimiento de acuerdo con la invención no se utilizan tiempos de reticulación adicionales antes de la liofilización, el tiempo de permanencia de la suspensión de colágeno antes de la realización de la liofilización asciende como máximo 24 horas y la reticulación tiene lugar esencialmente a continuación en el transcurso del proceso de liofilización. En particular se descubrió que una temperatura de liofilización  $\geq 40$  °C, preferentemente  $\geq 50$  °C, más preferentemente  $\geq 60$  °C es ventajosa para una realización de procedimiento óptima. Dado que en el procedimiento de acuerdo con la invención la reacción de reticulación tiene lugar esencialmente durante la liofilización, temperaturas de reticulación más altas permiten, tal como se definió anteriormente, tiempos de liofilización especialmente cortos y por lo tanto tiempos de reticulación especialmente cortos, sin tener repercusiones desventajosas sobre el grado de reticulación y por lo tanto la estabilidad en material resultante. Además la ventaja del tiempo resulta de la realización de la reacción de reticulación y la reacción de congelación en una única etapa.

Opcionalmente en el procedimiento de acuerdo con la invención se ajusta a continuación el contenido de humedad del material de colágeno reticulado liofilizado a un contenido de humedad hasta como máximo 25 % en peso, con respecto al material de colágeno liofilizado (rehumectación). Más preferentemente tiene lugar el ajuste a un contenido de humedad hasta el 20 % en peso, aún más preferentemente hasta el 15 % en peso, en cada caso con respecto al material de colágeno liofilizado. Preferentemente tiene lugar una rehumectación o ajuste del contenido de humedad hasta al menos el 3 % en peso, más preferentemente hasta al menos el 5 % en peso, aún más preferentemente hasta al menos el 7 % en peso, en cada caso con respecto al material de colágeno liofilizado. En particular es favorable ajustar el contenido de humedad a un contenido entre el 3 y el 25 % en peso, más preferentemente entre el 5 y el 20 % en peso, aún más preferentemente entre el 7 y el 15 % en peso, en cada caso con respecto al material de colágeno liofilizado. La rehumectación o ajuste del contenido de humedad puede tener lugar a este respecto en principio de acuerdo con procedimientos conocidos para la climatización o ajuste de humedad. Por ejemplo los materiales de colágeno liofilizados de acuerdo con la invención puede ajustarse o acondicionarse de manera correspondiente mediante almacenamiento en condiciones del entorno controladas en cuanto al clima, adecuadas, por ejemplo a una temperatura entre 10 - 25 °C, una humedad relativa del aire entre 40 - 95 %, más preferentemente entre el 50-75 % a lo largo de un periodo de tiempo adecuado por ejemplo entre 5 - 120 h, más preferentemente entre 12 - 80 h. En principio el experto puede combinar de manera adecuada la posición, los parámetros mencionados temperatura, humedad del aire y tiempo de almacenamiento, para conseguir los mejores resultados posibles con respecto al ajuste de la humedad deseado.

De manera sorprendente se descubrió que un ajuste de este tipo del contenido a enumerar de los materiales de colágeno liofilizados es ventajoso con respecto a la actividad residual del agente de reticulación de epóxido en el material liofilizado. En particular pudo mostrarse por medio de los métodos de determinación definidos en el presente documento que mediante la elección adecuada de las condiciones de rehumectación (contenido de humedad, tiempo de almacenamiento) pudo acelerarse claramente la reducción de la actividad residual de epóxido en una medida ya no detectable. En particular es por lo tanto también posible, mediante la elección de los parámetros de rehumectación, controlar de manera dirigida la degradación de la actividad residual de epóxido, y por lo tanto incluir de manera ventajosa desde el punto de vista económico en el desarrollo del procedimiento.

Las matrices de colágeno liofilizadas reticuladas con epóxido de acuerdo con la invención obtenidas de este modo representan preferentemente cuerpos moldeados porosos, de tipo esponja, que pueden dado el caso cortarse, esterilizarse y confeccionarse en una forma deseada.

A este respecto la transferencia de los materiales de colágeno a la forma deseada de acuerdo con la etapa h) tiene lugar convenientemente mediante recorte. A este respecto el recorte puede tener lugar en principio en cualquier forma geométrica deseada o grosor con procedimientos habituales, conocidos.

En particular en la aplicación terapéutica es importante la esterilización de las matrices de colágeno de acuerdo con la invención, promediándose también en este caso a procedimientos habituales. Se prefiere una esterilización por medio de radiación de rayos gamma.

La confección comprende dado el caso la impresión, estampación, acuñación, perforación y/o laminación así como eventualmente el grabado (cambio de la estructura superficial) por medio del láser de las matrices de colágeno de acuerdo con la invención así como el empaquetado.

Las matrices de colágeno porosas de acuerdo con la invención se proporcionan preferentemente en forma de un material en forma de capa, que presenta un grosor (dimensión, que tiene la menor extensión en longitud) de preferentemente aproximadamente 0,1 a 30 mm, preferentemente 0,5 - 20 mm, aún más preferentemente 1-10 mm.

Las matrices de colágeno reticuladas de acuerdo con la invención pueden contener además de colágeno opcionalmente al menos un constituyente adicional que se selecciona del grupo que consiste en los formadores de

estructura adicionales, principios activos y/o sustancias auxiliares cosméticas o farmacéuticas.

Del grupo de los formadores de estructura adicionales se selecciona preferentemente alginatos, elastina, ácido hialurónico.

5 Principios activos cosméticos en el sentido de la invención comprenden en particular aquellos principios activos que son apropiados, para aplicarse de manera externa en el ser humano para la limpieza, el cuidado y/o influir en el aspecto o el olor corporal, o para mediar impresiones olfativas, o ya sea que sean apropiados principalmente para aliviar o eliminar enfermedades, dolencias, daños corporales o dolores patológicos. En este sentido en el caso de los materiales de acuerdo con la invención para el uso cosmético se trata por ejemplo de preparados para el baño, agentes para el lavado y limpieza de la piel, agentes para el cuidado de la piel, en particular agentes para el cuidado de la piel de la cara, cosméticos para los ojos, agentes para el cuidado de los labios, agentes para el cuidado de las uñas, agentes para el cuidado de los pies, agentes para el cuidado del cabello, en particular champús para el cabello, acondicionadores para el cabello, suavizantes para el cabello etc., agentes fotoprotectores, agentes para el bronceado y para el aclarado de la piel, agentes de despigmentación, desodorantes, antidiuréticos, agentes de depilación, repelentes de insectos etc. o agentes de este tipo en combinación. En particular se prefiere el uso como capa cosmética o máscara.

20 Los ejemplos de compuestos de acción cosmética opcionalmente también por ejemplo dermatológica, terapéuticamente activos incluyen: agentes antiacné, agentes antimicrobianos, agentes antitranspiración, agentes astringentes, agentes desodorantes, agentes de depilación, agentes de acondicionamiento para la piel, agentes suavizantes de la piel, agentes para el aumento de la hidratación de la piel tal como por ejemplo dexpanthenol (pantenol, pantotenol), glicerol o urea así como otros NMF (Natural Moisturing Factors) tal como por ejemplo ácido pirrolidoncarboxílico, ácido láctico y aminoácidos, protectores solares, queratolíticos, iluminadores de radicales para radicales libres, agentes antioxidantes, antiseborreicos, agentes anticasma, principios activos antisépticos, principios activos para el tratamiento de los signos del envejecimiento de la piel y agentes que modulan la diferenciación y/o proliferación y/o pigmentación de la piel, inhibidores de proteasas, por ejemplo MMP (Inhibidores de Metaloproteinasas de Matriz), inhibidores de glicación para la reducción de la generación de AGE (Sustancias Advanced Glycation Endproduct), Vitaminas tal como Vitamina C (ácido ascórbico) y sus derivados tal como por ejemplo glucósidos tal como ascorbilglucósido o ésteres del ácido ascórbico tal como ascorbilfosfato de sodio o magnesio o palmitato de ascorbilo y estearato de ascorbilo, ésteres de fosfato de ácido L ascórbico, sales de metal alcalino tal como sales de sodio y de potasio de ésteres de fosfato de ácido L ascórbico; sales de metal alcalinotérreo tal como sales de magnesio y sales de calcio, ésteres de fosfato de ácido L ascórbico; sales de metal trivalentes tal como sales de aluminio de ésteres de fosfato de ácido L ascórbico; sales de metal alcalino de ésteres de sulfato de ácido L ascórbico tal como sales de sodio y sales de potasio de ésteres de sulfato de ácido L ascórbico; sales de metal alcalinotérreo tal como sales de magnesio y de calcio de ésteres de sulfato de ácido L ascórbico, sales de metal trivalentes tal como sales de aluminio de ésteres de sulfato de ácido L ascórbico; sales de metal alcalino tal como sales de sodio y de potasio de ésteres de ácido L ascórbico; sales de metal alcalinotérreo tal como sales de magnesio y sales de calcio de ésteres de ácido L ascórbico; y sales de metal trivalentes tal como sales de aluminio de ésteres de ácido L ascórbico, cualquier péptido natural, idéntico natural y artificial tal como por ejemplo neuropéptidos, péptidos antimicrobianos y matricidas con y sin modificación mediante enlace covalente a un ácido graso o esterificación.

45 Principios activos con efecto secundario irritante, tal como alfa hidroxiácidos,  $\beta$ -hidroácidos, alfa-cetoácidos,  $\beta$ -cetoácido, retinoides (retinol, retinal, ácido retínico) antralininas (dioxiantranol), antranoides, peróxidos (en particular benzoíloperóxido), minoxidilo, sales de litio, antimetabolitos, vitamina D y sus derivados, catequinas, flavonoides, ceramidas, ácidos grasos poliinsaturados, ácidos grasos esenciales (por ejemplo ácido gamalinolénico), principios activos con estructuras liposómicas, sistemas de portador, enzimas, coenzimas, inhibidores enzimáticos, agentes hidratantes, agentes calmantes para la piel, detergentes o agentes formadores de espuma y materiales de relleno inorgánicos o sintéticos de mateado, o sustancias decorativas tal como pigmentos o colorantes y partículas para bases de maquillaje formulaciones de maquillaje y otros agentes para el embellecimiento cosmético y la forma con color de ojos, labios, cara, etc. así como agentes abrasivos.

55 Además pueden mencionarse extractos de principios activos vegetales o fragmentos o sustancias individuales obtenidos a partir de los mismos. En general el extracto de principio activo vegetal se selecciona por regla general del grupo que se compone de extractos vegetales, extractos vegetales líquidos, extractos vegetales hidrófilos, extractos vegetales lipófilos, sustancias contenidas vegetales individuales; así como sus mezclas, tal como flavonoides y sus álglicas; rutina, quercetina, disemina, hiperósido (neo)hesperidina, hesperitina, *Ginkgo Biloba* (por ejemplo glicósidos flavonoides de Ginkgo), extracto de *Crataegus* (por ejemplo prociamidinas oligoméricas), alforfón (por ejemplo rutina), *Sophora japonica* (por ejemplo rutina), hojas de abedul (por ejemplo quercetinglicósido, hiperósido y rutina), flores de saúco (por ejemplo rutina), flores de lino (por ejemplo aceite etéreo con quercetina y farnesol), aceite de hierba de San Juan o extracto de hierba de San Juan, aceite de onagra, (por ejemplo extracto de aceite de oliva), caléndula, árnica (por ejemplo extractos oleosos de las flores con aceite etéreo, extractos polares con flavonoides), melisa (por ejemplo flavonas, aceite etéreo); inmuoestimulantes: *Echinacea purpurea* (por ejemplo extractos alcohólicos, jugo de plantas frescas, jugo de prensado), *Eleutherokokkus senticosus*; alcaloides: cafeína, teína, te negro o extracto de te negro, teobromina, capsaicina, Rauwolfia (por ejemplo pragmalina),

perennes (por ejemplo vitamina); citofármacos adicionales: aloe, castaño de indias (por ejemplo aescina), ajo (por ejemplo aceite de ajo), piña (por ejemplo bromelaína), ginseng (por ejemplo gingenósidos), frutos de cardo mariano (por ejemplo extracto normalizado a silimarina), raíz de rusco (por ejemplo ruscogenina), baldriana (por ejemplo Valepotriate, Tct, Valerianae), Kava-Kava (por ejemplo kavalactonas), flores de lúpulo (por ejemplo sustancias amargas de lúpulo), extr. de pasiflora, enzian (por ejemplo etanol, extracto), extractos de drogas que contienen antraquinona, por ejemplo jugo de Aloe Vera que contiene aloína, extracto de polen, extracto de algas, extractos de regaliz, extracto de palma, galfimia (por ejemplo Urtinktur), muérdago (por ejemplo etanol acuoso, extracto), fitoesteroles (por ejemplo beta-sitosterina), flores de algodón (por ejemplo alcohol acuoso, extracto), Drosera (por ejemplo extracto de vino licoroso), frutos de espino falso (por ejemplo jugo obtenido del mismo o aceite de espino falso), raíz de malvasisco, extracto de raíz de primula, extractos vegetales frescos de malva, consuelda, hiedra, cola de caballo, aquilea, llantén menor (por ejemplo jugo prensado), ortiga, celidonia, perejil; extractos vegetales de *Norolaena lobata*, *Tagetes lucida*, *Teeoma siems*, *Momordica charantia*, y extractos de Aloe Vera, *Cardiospermum Urtinktur*, extracto de *Dulcamara*, así como taninos tal como tanino.

A diferencia de los principios activos descritos anteriormente usados esencialmente en la cosmética en el caso de los principios activos terapéuticos (fármacos) se trata de aquellos que en el sentido de la ley de medicamentos entre otros son apropiados para curar aliviar o prevenir enfermedades, dolencias, daños corporales o dolores patológicos,. De acuerdo con la invención son adecuados en particular aquellos agentes o principios activos que son apropiados para la aplicación exterior o transdérmica, en particular en el campo de la cicatrización y el tratamiento de heridas así como en el campo del tratamiento de quemaduras, en particular para la atención primaria de quemaduras.

En el caso de principios activos para una aplicación dérmica o transdérmica se trata en particular de principios activos para la piel pero también principios activos transdérmicos. Estos incluyen por ejemplo: agentes para el tratamiento de quemaduras, agentes para el tratamiento de enfermedades de la piel, analgésicos de aplicación externa, por ejemplo dextropropoxifeno, pentazocina, petidina, buprenorfina; antiirreumáticos/antiflogísticos (inhibidores de la inflamación (AINE), por ejemplo incienso o extracto de incienso, indometacina, diclofenaco, naproxeno, quetoprofeno, ibuprofeno, flurbiprofeno, ácido salicílico y derivados de ácido salicílico tal como ácido acetilsalicílico, oxicame; hormonas esteroideas ,por ejemplo corticoides y glucocorticoides tal como hidrocortisona, cortisol, acetato de cortisona, cloprednol, prednisona, prednisolona, deflazacort, fluocorolón, triaminolón, betametasona, valerato de betametaasona, fluorato de mometasona, dexametasona, metilprednisolona, etinilestradiol, medroergotamina, dihidroergotoxina; agentes contra la gota, por ejemplo benzbromarón, alopurinol; agentes dermatológicos externos, antihistamínicos tal como bromofenilamina, bamipina; antibióticos tal como eritromicina, clindamicina, tetraciclina, inclusive agentes antibacterianos tal como por ejemplo plata coloidal y sales de plata tal como cloruro de plata, nitrato de plata, yoduro de plata u otras sustancias para el tratamiento de heridas que contienen plata conocidas por el estado de la técnica, antimicóticos, medicamentos peptídicos, principios activos antivirales, principios activos antiinflamatorios, principios activos antipruríticos tal como, principios activos anestésicos, por ejemplo antihistamínicos, benzocaína, polidocanol o corticoides y glucocorticoides; agentes antiacné; principios activos antiparasitarios; hormonas de uso externo; agentes terapéuticos circulatorios; inmunosupresores tal como inhibidores del calcineurina tal como tacrolimus y pimecrolimus, sustancias minerales y oligoelementos tal como por ejemplo compuestos de selenio inorgánicos u orgánicos, zinc y sales de zinc, etc. todos para la aplicación dérmica o transdérmica.

Como aclaración ha de señalarse que la clasificación de los principios activos en el grupo de los principios activos cosméticos o terapéuticos en el contexto de la presente invención no representan ninguna asociación exclusiva. En particular la clasificación efectuada en este caso no excluye que los principios activos correspondientes tengan aplicación tanto como principios activos cosméticos así como también como principios activos terapéuticos.

Principios activos preferidos para la aplicación térmica y transdérmica se seleccionan del grupo que contiene: agentes para el tratamiento de enfermedades de la piel tal como neurodermitis, la dermatitis atópica, soriasis, rosácea, etc. principios activos antiinflamatorios, principios activos antipruríticos, taninos, analgésicos tópicos, anestésicos y principios activos antibacterianos.

A este respecto se prefiere especialmente al menos un principio activo seleccionado del grupo de los lípidos similares a la piel, que comprende por ejemplo fosfolípidos, lípidos neutros y esfingolípidos así como componentes del factor de retención de la hidratación natural de la piel, el denominado Natural Moisturizing Factors (NMF), que comprende por ejemplo urea, aminoácidos y ácidos carboxílicos, ácido pirrolidona carboxílico, sodio, potasio, calcio, magnesio, lactato (ácido láctico), citrato, cloruro, fosfato, etc., ácido úrico y otros ácidos orgánicos.

Además se prefieren especialmente aquellos principios activos que se utilizan en el campo del tratamiento de las heridas, en particular para el tratamiento de heridas crónicas, decubitis, Ulcus cruris, síndrome de pie diabético etc., tal como por ejemplo analgésicos por ejemplo inmunosupresores, hormonas, principios activos anestésicos, antiparasitarios, fungidas o antimicóticos y antibacterianos, tal como por ejemplo principios activos que contienen plata tal como por ejemplo nitrato de plata, cloruro de plata, yoduro de plata, micropartículas de plata, u otras sustancias para el tratamiento de heridas que contienen plasta conocidas por el estado de la técnica, principios activos para soportar y regular el medio de la herida tal como en particular electrolitos, tierras silíceas, sustancias minerales y oligoelementos tal como por ejemplo potasio, magnesio, calcio, selenio, yodo, etc., principios activos

para alcanzar un desbridamiento de heridas tal como por ejemplo colagenasas u otras enzimas proteolíticas adecuadas conocidas en el estado de la técnica así como principios activos para soportar la cicatrización tal como por ejemplo factores de crecimiento, inhibidores enzimáticos, proteínas de matriz o constituyentes de matriz extracelulares o constituyentes peptídicos y proteicos solubles (de bajo peso molecular), tipos de colágeno distintos de los colágenos de Tipo I, III y V contenidos ya en la suspensión de colágeno utilizada de acuerdo con la invención.

Principios activos preferidos del campo de los agentes de tratamiento para el tratamiento de heridas se selecciona de principios activos que contienen plata tal como en particular nitrato de plata, cloruro de plata, micropartículas de plata, tacrolimus, pimecrolimus, antihistamínicos, polidocanol, incienso, extracto de incienso, capsaicina, tanina, aceite de hierba de San Juan/extracto de hierba de San Juan, aceite de onagra, dexpanthenol así como compuestos de selenio inorgánico u orgánicos, zinc y sales de zinc.

Otros principios activos preferidos son aquellos del grupo de los principios activos proteinógenos, que comprende preferentemente factores de crecimiento, hormonas proteinógenas, enzimas, coenzimas, glicoproteínas, factores de la coagulación sanguínea, otras citocinas y variantes producidas de manera recombinante de los principios activos mencionados anteriormente.

Factores de crecimiento que pueden utilizarse de acuerdo con la invención se seleccionan preferentemente del grupo que se compone de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), FGF-1 (Fibroblast Growth Factor ácido), TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$  (Transforming Growth Factor  $\beta$  o  $\alpha$ ), EGF (Endothelial Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor), TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), IGF I o II (Insulin-like Growth Factor / Insulin Binding Growth Factor I o II), Heparin Binding Growth Factor I o II, PDGF (Platelet Derived Growth Factor), PD-ECGF (Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor), BMP (Bone Morphogenetic Growth Factor), GHRP (Growth Hormone Release Factor), Cartilage Inducing Factor A o B, Bone Growth Factors, interleucina 8, angiopoyetina, angiogenina, aprotinina, y vWF (Factor de von Willebrand).

Glicoproteínas como principios activos incluyen por ejemplo inmunoglobulinas y anticuerpos.

Otras citocinas como principios activos incluyen por ejemplo interleucinas e interferón.

Principios activos preferidos adicionales son aquellos que presentan un efecto hemostático o de contención de la sangre, tal como por ejemplo factores de coagulación sanguínea tal como por ejemplo trombina, fibrinógeno o colesterilsulfato (por ejemplo colesterilsulfato de sodio) o principios activos con actividad activante sobre factores y sustancias de la cascada de coagulación extrínseca y/o intrínseca tal como por ejemplo fosfolípidos, caolín, aprotinina, concentrados de factor o factores, factor tisular o iones calcio.

Además puede concebirse administrar otros principios activos tal como terapéuticos bronquiales tal como antihistamínicos, antitusivos, mucolíticos etc., antidiabéticos tal, por ejemplo glibenclamida, hormonas, hormonas esteroideas tal como dexametasona, glicósidos cardiacos tal como digitoxina, terapéuticos cardiacos y circulatorios tal como por ejemplo betabloqueantes, antiaritmicos, antihipertónicos, antagonistas del calcio etc., psicofármacos y antidepresivos tal como por ejemplo antidepresivos tricíclicos (NSMRI), inhibidores de la reabsorción de serotonina (SSRI), inhibidores de la reabsorción de noradrenalina (NRI), inhibidores de la reabsorción de serotonina noradrenalina (SNRI), inhibidores de monoaminoxidasa (inhibidores MAO) etc., neurolépticos, anticonvulsivos, antiépilépticos, hipnóticos, sedantes, anestésicos, terapéuticos estomacales intestinales, productores lipídicos, analgésicos tal como por ejemplo agentes antimigraña, paracetamol, ácido salicílico y derivados salicílicos tal como ácido acetilsalicílico, diclofenaco, ibuprofeno, quetoprofeno, naproxeno etc., antiflogísticos, vasodilatadores, diuréticos, agentes antigota, citoestáticos, relajantes musculares, anticonceptivos por ejemplo en forma de parches hormonales, agentes de desintoxicación en forma por ejemplo de parches de nicotina, extractos vegetales, provitaminas tal como por ejemplo beta carotina, vitaminas tal como por ejemplo vitamina C, A, B, E etc., a través de una aplicación transdérmica en una composición de acuerdo con la invención por ejemplo en forma de un parche de principio activo transdérmico.

De acuerdo con la invención se prefiere muy especialmente añadir como formadores de estructura adicionales o principio activo aquellas sustancias que se seleccionan del grupo de las proteínas de matriz, constituyentes de matriz extracelulares o constituyentes peptídicos y proteicos solubles (de bajo peso molecular) preferentemente del grupo que comprende elastina, hidrolizados de elastina, glicosaminoglicanos, tal como heparán sulfato, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, sulfato de queratán, heparina y ácido hialurónico, proteoglicanos, tal como agregán, fibromodulina, decorina, biglicano, versicán, perlecán, proteoglicanos de membrana basal de alta densidad, sindecán y serglicina, fibrina, fibronectina, glucanos, tal como paramilón etc. Constituyentes de matriz extracelulares de este tipo preferidos muy especialmente o formadores de estructura son elastina e hidrolizados de elastina, ácido hialurónico y fibronectina.

También el material de colágeno puede presentar en sí ciertos efectos terapéuticos, tal como en particular un efecto hemostático o un efecto de soporte positivo en la cicatrización. Sin embargo no es ningún principio activo en el sentido de la invención.

Los principios activos mencionados anteriormente están presentes solos o en combinación de varios principios activos en las matrices de colágeno reticuladas preferentemente en una cantidad de convenientemente hasta el 40 % en peso, preferentemente hasta el 60 % en peso, más preferentemente hasta el 40 % en peso, con respecto al producto final liofilizado.

5 Los formadores de estructura o principios activos del grupo de las proteínas de matriz, constituyentes de matriz extracelulares, principios activos proteinógenos y constituyentes peptídicos o proteicos solubles, pueden constituir en las matrices de colágeno liofilizadas junto con por ejemplo constituyentes peptídicos y de colágeno solubles en ácido presentes a partir del tratamiento de la suspensión de colágeno utilizada preferentemente en total un porcentaje de hasta el 10 % en peso, más preferentemente hasta el 20 % en peso con respecto a la masa seca del producto final liofilizado, medido de acuerdo con el método de determinación definida en el presente documento (BCA).

15 Las matrices de colágeno de acuerdo con la invención pueden comprender opcionalmente al menos una sustancia auxiliar.

20 Las sustancias auxiliares incluyen: agentes de ajuste del pH, tal como sustancias tampón, ácidos o bases inorgánicos y orgánicos; sustancias grasas, tal como aceites minerales, tal como aceites de parafina, o aceites de vaselina, aceites de silicona, aceites vegetales tal como aceite de coco, aceite de almendras dulces, aceite de albaricoque, aceite de maíz, aceite de yoyoba, aceite de oliva, aceite de aguacate, aceite de sésamo, aceite de palma, aceite de eucalipto, aceite de romero, aceite de lavanda, aceite de pino, aceite de tomillo, aceite de menta, aceite de cardamomo, aceite de flor de naranja, aceite de soja, aceite de salvado, aceite arroz, aceite de colza y aceite de ricino, aceite de germen de trigo y vitamina E aislada a partir del mismo, aceite de onagra, lecitinas vegetales (por ejemplo lecitina de soja), esfingolípidos/ceramidas aisladas a partir de plantas, aceites animales o grasas, tal como sebo, lanolina, aceite de mantequilla, aceite neutro, escualano, ésteres de ácido graso, ésteres de alcoholes grasos tal como triglicéridos, y ceras con un punto de fusión correspondiente a la temperatura de la piel (ceras animales, tal como cera de abejas, cera de carnauba y cera de candelilla, ceras minerales tal como ceras microcristalinas y ceras sintéticas tal como ceras de polietileno o de silicona), así como todos los aceites adecuados para fines cosméticos (denominados aceites cosméticos), tal como se menciona por ejemplo en el tratado CTFA, 30 Cosmetic Ingredient Handbook, 1ª edición, 1988, The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc., Washington, agentes tensioactivos además de los tensioactivos de lavado mencionados anteriormente, tal como agentes de dispersión, humectantes, emulsionantes etc.; materiales de relleno; estabilizadores, codisolventes, colorantes de uso farmacéutico y cosmético u otros colorantes y pigmentos, en particular aquellos que se utilizan en principio para dar color a la composición de hidrogel y no para la aplicación y dar color en el cuerpo humano, tal como aquellos pigmentos y colorantes como los colorantes decorativos expuestos en el grupo de los principios 35 activos; agentes conservantes; plastificantes; lubricantes o deslizantes; etc.

40 Sustancias auxiliares preferidas de acuerdo con la invención son grasas y aceites. A este respecto se enumeran en particular aceites cosméticos tal como anteriormente, preferentemente en particular triglicéridos, de manera especialmente preferente triglicéridos de ácido caprílico/caproico, escualano o aceite de yoyoba así como aceite de onagra.

45 Las sustancias auxiliares mencionadas anteriormente están presentes solas o en combinación de varias sustancias auxiliares en las matrices de colágeno reticuladas preferentemente en una cantidad de convenientemente hasta el 80 % en peso, preferentemente hasta el 60 % en peso, de manera más preferentemente hasta el 40 % en peso con respecto al producto final liofilizado.

50 En general la clasificación de las sustancias mencionadas anteriormente en la categoría de las sustancias auxiliares en el contexto de la presente invención no excluye que estas sustancias auxiliares también puedan desarrollar ciertos efectos terapéuticos y/o cosméticos, lo que es válido en especial medida para los aceites cosméticos utilizados preferentemente mencionados.

55 Si los materiales de colágeno de acuerdo con la invención contienen una combinación de sustancias contenidas adicionales de al menos dos de los grupos mencionados, formadores de estructura, principios activos y/o sustancias auxiliares, entonces el porcentaje total de estas sustancias contenidas adicionales en la matriz de soporte de colágeno porosa asciende en conjunto hasta el 40% en peso, preferentemente hasta el 60 % en peso, más preferentemente hasta el 80 % en peso, en cada caso con respecto al material de colágeno liofilizado.

60 A este respecto el porcentaje de tales formadores de estructura, principios activos y/o sustancias auxiliares, o bien solos o bien combinación de al menos dos de los grupos mencionados no asciende preferentemente a menos del 0,1 % en peso preferentemente a no menos del 1 % en peso.

65 Tal como ya se expuso una ventaja adicional y procedimiento de acuerdo con la invención consiste en que mediante la especial realización de procedimiento, en particular también la baja actividad residual de epóxido debido a la técnica de procedimiento y la posibilidad de la inactivación de posibles actividades residuales mediante el ajuste de la humedad después de la liofilización, no debe llevarse a cabo ninguna separación por lavado del reticulante de

epóxido, tal como se conoce por ejemplo por procedimientos de acuerdo con el estado de la técnica (por ejemplo grupo Zeeman). Esto no es solo importante para obtener los constituyentes peptídicos y de colágeno solubles en ácido de la suspensión de colágeno utilizada de manera liberable en el material reticulado, liofilizado, sino igualmente también para formadores de estructura adicionales o principios activos del grupo de las proteínas de matriz, constituyentes de matriz extracelulares, principios activos proteinógenos y constituyentes peptídicos o proteicos solubles, tal como se define en el presente documento, por ejemplo elastina etc., que se añaden adicionalmente a la suspensión de colágeno. Como requisito para que tales constituyentes desplieguen su efecto positivo durante la aplicación, estos deben poder liberarse durante la aplicación a partir de la matriz de colágeno reticulada, que funciona casi como material de soporte. Para ello es imprescindible que tales principios activos proteinógenos y constituyentes permanezcan fundamentalmente no reticulados en el material y no reticulen conjuntamente y por lo tanto se unan de manera no separable mediante la adición de epóxido en el material de colágeno. Mediante el procedimiento de acuerdo con la invención es posible incorporar estos constituyentes de proteína de matriz solubles no reticulados en el material de colágeno y en ellos principalmente no reticulados, entre otras cosas también dado que en procedimiento de acuerdo con la invención se proporcionan extremadamente pocos agentes de reticulación de epóxido. Mediante esta pequeña cantidad de agente de reticulación tiene lugar la región de reticulación de manera determinante entre las pequeñas cantidades del agente de reticulación de epóxido y los péptidos de colágeno presentes en exceso como componente de reacción, en lugar de con las moléculas de matriz proteinógenas de bajo peso molecular.

En conjunto el porcentaje de tales constituyentes proteinógenos que pueden liberarse durante la aplicación, solubles, no reticulados en las matrices de colágeno de acuerdo con la invención asciende al menos al 0,1 % en peso, preferentemente al menos al 2 % en peso, de manera especialmente preferente  $\geq$  el 5 % en peso, en cada caso con respecto a la masa seca del material de colágeno liofilizado. El porcentaje de tales constituyentes solubles liberables, que comprende constituyentes peptídicos y de colágeno solubles en ácido y/o formadores de estructura o principios activos del grupo de las proteínas de matriz, constituyentes de matriz extracelulares, principios activos proteinógenos y constituyentes peptídicos o proteicos solubles, asciende de manera ventajosa como máximo hasta el 20 % en peso.

A este respecto el porcentaje cuantitativo de tales constituyentes peptídicos y de colágeno liberables solubles puede determinarse por ejemplo por medio de Ensayo BCA (Bi-Chinoinic-Acid-Assay) en comparación con albúmina de suero bovino como patrón en el sobrenadante después de la extracción en NaCl al 0,9 % durante 24 h a 37 °C, tal como se representa en el presente documento en detalle.

En el procedimiento de acuerdo con el estado de la técnica reticularon conjuntamente y por lo tanto se unieron de manera no separable al material de soporte tales constituyentes proteinógenos solubles debido a la alta cantidad de agente de reticulación. Posibles restos no reticulados se separarían por lavado conjuntamente además mediante el lavado necesario en el desarrollo de procedimiento adicional del reticulante de epóxido residual para la reducción de la actividad residual de epóxido a partir del material.

En una forma de realización especialmente preferida del procedimiento a la suspensión de colágeno no se añade ningún polímero hidrófilo sintético en particular ningún polímero hidrófilo sintético activo funcionalmente, tal como por ejemplo un glicol, tal como en particular un polietilenglicol activado bifuncionalmente, antes de la adición del agente de reticulación. De manera correspondiente formas de realización especialmente preferidas de las matrices de colágeno reticuladas de acuerdo con la invención se refieren a aquellas que no comprenden ningún conjugado de un colágeno con un polímero sintético.

Tal como se expuso anteriormente las matrices de colágeno reticuladas con epóxido liofilizadas de acuerdo con la invención ya no presentan a más tardar después de la etapa del ajuste de la humedad ninguna actividad residual de epóxido detectable, medida de acuerdo con métodos descritos en el presente documento.

Además de esto se mostró que los materiales de colágeno que pueden obtenerse de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención no presentan ninguna toxicidad también en procedimientos convencionales *in vitro* para la determinación de la toxicidad (Ensayo XTT) lo que es una prueba adicional para la alta biocompatibilidad de tales materiales de colágeno reticulados.

Las matrices de colágeno reticuladas con epoxi liofilizadas de acuerdo con la invención se caracterizan además por una estabilidad frente a la degradación mejorada, de manera correspondiente a una tasa de degradación reducida (descomposición de colagenasa/digestión por colagenasa), una estabilidad frente a la hidrólisis mejorada así como una estabilidad mecánica elevada en el sentido de una resistencia a la rotura por tracción en húmedo mejorada, en cada caso tal como se define y se describe a continuación.

Dado que la velocidad de degradación o la tasa de degradación reflejan la estabilidad de matrices de colágeno frente a la descomposición enzimática, en particular frente a la digestión por colagenasa, esta puede determinarse por ejemplo por medio de ensayo de digestión con colagenasa. A este respecto se provoca de manera controlada la descomposición de las fibras de colágeno y fibrillas mediante la enzima colagenasa (colagenasa de *Clostridium histolyticum* (Tipo 1) en PBS (Tampón de Solución Salina Tamponada con Fosfato) en condiciones controladas, y

después de una duración de reacción definida termina por medio de medición UV/VIS en un fotómetro espectral el porcentaje de los productos de descomposición, tal como se representa en los siguientes ejemplos en detalle.

5 Las matrices de colágeno estabilizadas frente a la degradación de acuerdo con la invención se caracterizan después por una reducción de la tasa de degradación, en el sentido de una reducción del porcentaje de productos de descomposición solubles, en comparación con colágeno liofilizado no reticulado o reticulado únicamente de manera deshidrotérmica, puede determinarse por medio de ensayo de digestión con colagenasa tal como se describe en el presente documento.

10 A este respecto la tasa de degradación es por un lado dependiente de la cantidad de agente de reticulación usado, sin embargo por otro lado también del porcentaje de constituyentes de proteínas solubles posiblemente añadidos (proteínas de matriz, etc.). Mediante los parámetros de procedimiento usados pueden controlarse las propiedades de degradación en función del campo de aplicación deseado.

15 Las matrices de colágeno de acuerdo con la invención muestran preferentemente una tasa de degradación, medida en el instante de reacción 6 horas después de la adición de la colagenasa en comparación con colágeno liofilizado no reticulado o reticulado únicamente de manera deshidrotérmica (tasa de degradación del 100 %) de como máximo el 85 %, preferentemente como máximo el 70 %, más preferentemente como máximo el 50 %. Esto significa una mejora de la estabilidad frente a la degradación en al menos un 15 %, preferentemente al menos un 30 %, de manera especialmente preferente al menos un 50 % en comparación con colágeno no reticulado o solo reticulado de manera deshidrotérmica.

25 En un método adicional para la determinación de la tasa de degradación de la matriz de colágeno se determina la velocidad de degradación de la matriz de colágeno mediante determinación del peso de una muestra antes y después de la descomposición enzimática mediante colagenasa de *Clostridium histolyticum* (Tipo I, Worthington Biochemicals). Para ello se sumergen pedazos definidos de las matrices de colágeno en una solución, que contiene unidades definidas de colagenasa en 1 ml de PBS (pH 7,2) y se incuba con agitación suave a 37 °C durante 2 horas. La degradación se detiene mediante adición de 0,2 ml de una solución de EDTA 0,25 M y se enfría durante 10 minutos sobre el hielo. A continuación se lava la muestra con 5 ml de tampón PBS (pH 7,2) tres veces durante 15 minutos, con 5 ml de agua desmineralizada tres veces durante 15 minutos, se congela a -80 °C durante la noche y a continuación se liofiliza. Después de la liofilización se determina el peso de la muestra de soporte de colágeno parcialmente degradada y se determina la velocidad de degradación tal como sigue:

35 
$$\text{Velocidad de degradación (\%)} = 100 \times (\text{peso original} - \text{peso después de la descomposición}) / \text{peso original}$$

40 Las matrices de colágeno de acuerdo con la invención se caracterizan después por una velocidad de degradación de como máximo aproximadamente el 60 %, más preferentemente como máximo aproximadamente el 50 % aún más preferentemente como máximo aproximadamente el 40 %, y preferentemente la velocidad de degradación asciende al menos a aproximadamente el 2 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 4 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 8 %, aún más preferente al menos aproximadamente el 10 %.

45 Según el grado de reticulación las matrices de colágeno reticuladas de acuerdo con la invención representan materiales reabsorbibles más o menos rápido. Es decir un material con bajo grado de reticulación se degrada enzimáticamente después de aplicación subcutánea o intramuscular en las condiciones que reinan e el organismo es decir después de la puesta en contacto con la herida el material puede permanecer sobre o en la misma y promover ahí la cicatrización. Se suprime de manera ventajosa una retirada del material. Una aplicación de este tipo es especialmente ventajosa en el caso del uso como agente para el tratamiento de heridas. Si tales agentes para el tratamiento de heridas están previstas para permanecer en la herida, se denominan también implantes degradables o descomponibles.

50 Un material de colágeno reticulado presenta además de una alta estabilidad mecánica (resistencia a la rotura por tracción) una estabilidad elevada contra la capacidad de descomposición biológica (por ejemplo degradación enzimática) y es especialmente adecuado como implante semipermanente para reconstrucción de tejidos o para el rellenado de defectos o como estructura de soporte para la colonización celular, por ejemplo en el campo de la ingeniería de tejidos.

55 Una velocidad de degradación baja y por lo tanto alta estabilidad frente a la degradación de las matrices de colágeno es ventajosa en particular también para el uso como capa cosmética, estructura para la colonización celular o en el uso como material de esponja que absorbe exudado de herida por ejemplo en una terapia de tratamiento de heridas soportada por vacío.

60 Sin embargo, por otro lado, es indeseable una tasa de degradación demasiado baja de la matriz para la aplicación como agente para el tratamiento de heridas y como implante para el tratamiento de heridas degradable, dado que puede producirse un enquistamiento del material completamente no degradado en la herida o en el cuerpo y con ello la aparición de endurecimiento del tejido. Es por lo tanto de especial importancia de acuerdo con la invención ajustar

la velocidad de degradación/tasa de degradación para la aplicación deseada de forma óptima. Las propiedades de degradación del material de colágeno se ven afectadas tanto por la naturaleza del material obtenido, descrito anteriormente, como por las condiciones de secado o de reticulación empleadas sobre el mismo durante la producción de las matrices de colágeno de acuerdo con la invención. De acuerdo con la invención con el material de colágeno producido tal como se describe anteriormente en particular en combinación con las condiciones de producción preferidas descritas a continuación de la matriz de colágeno pueden obtenerse propiedades de degradación especialmente favorables en función del campo de aplicación deseado.

A este respecto materiales de colágeno en particular para la aplicación como capa cosmética, como estructura de soporte para la colonización celular en la ingeniería de tejidos así como material de capa para el uso en una terapia de tratamiento de heridas soportada por vacío presentan una tasa de degradación baja de cómo máximo el 50 %, de manera correspondiente a una mejora de la estabilidad frente a la degradación en al menos un 50 % en comparación con el colágeno no reticulado o reticulado solo de manera deshidrotérmica. Por el contrario los materiales de colágeno para la aplicación como agente para tratamiento de heridas o como agente para el tratamiento de heridas degradable para permanecer en la herida (implante degradable) o como implante para la construcción de tejidos así como para rebasar efectos cutáneos más profundos presentan una tasa de degradación menor de cómo máximo del 85 al 70 %, de manera correspondiente a una mejora de la estabilidad frente a la degradación en al menos un 15 a un 30 % en comparación con colágeno no reticulado o solo reticulado de manera deshidrotérmica.

En el sentido de la presente invención efecto de reticulación o grado de reticulación quiere decir por un lado la reducción que puede alcanzarse mediante la reticulación de la tasa de degradación o un aumento de la estabilidad frente a la degradación de la matriz de colágeno así como por otro lado la mejora de la estabilidad mecánica a través del aumento de la resistencia a la rotura por tracción (resistencia a la rotura por tracción en húmedo), que pueden determinarse en principio con métodos de determinación habituales, en particular con los métodos descritos en el presente documento, así como además el aumento de la rigidez del material, puede cuantificarse a través de la medición del módulo elástico.

Así, por ejemplo la resistencia de una estructura de colágeno con respecto a la colagenasa por ejemplo puede determinarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento (digestión con colagenasa), una medida para la reticulación, en el que el material no reticulado se descompone enzimáticamente de manera considerablemente más rápida que en el caso del material reticulado.

También la estabilidad frente a la hidrólisis representa una medida para la reticulación de una matriz de colágeno y se muestra por ejemplo mediante introducción de una cantidad definida de material de colágeno en una solución acuosa y determinación de la variación de las propiedades del material a lo largo del tiempo. Mientras que las matrices de colágeno no reticuladas o reticuladas de manera hidrotérmica en las condiciones seleccionadas (solución acuosa de 50 °C) después de < de 18 días mostraron una hidrólisis completa (disolución estructural de la estructura de matriz, en los materiales de colágeno reticulados de acuerdo con la invención en las mismas condiciones no se observó ningún cambio estructural de la matriz.

La resistencia a la rotura por tracción en húmedo de las matrices de colágeno de acuerdo con la invención puede determinarse de acuerdo con la norma DIN EN ISO 3376 y asciende preferentemente a > de 50 cN/mm de grosor de capa, más preferentemente > de 100 cN/mm, aún más preferentemente > de 300 cN/mm.

Preferentemente sin embargo la resistencia a la rotura por tracción en húmedo se determina con el uso de un método de medición interno (UV8801) tal como se describe en los siguientes ejemplos. Resistencias en la rotura por tracción en húmedo preferidas de las matrices de colágeno reticuladas de acuerdo con la invención, determinadas de acuerdo con este método interno (UV 8801), ascienden a > de 200 cN/mm de grosor de capa más preferentemente > de 400 cN/mm, aún más preferentemente > de 500 cN/mm.

Las matrices de colágeno reticuladas con epóxido liofilizadas de acuerdo con la invención muestran además una capacidad de absorción, de absorción de líquido y de almacenamiento de líquido claramente mejorada así como una elevada velocidad de mojadura o de humectación con respecto a las matrices de colágeno no reticuladas, así como con respecto a aquellas que se reticularon únicamente por medio de reticulación deshidrotérmica o con otros agentes de reticulación químicos conocidos.

La capacidad de absorción de líquido o capacidad de almacenamiento de líquido de las matrices de colágeno de acuerdo con la invención designa a este respecto la capacidad para la absorción de cantidades de líquido en particular en combinación con la capacidad de almacenar y contener estas cantidades de líquido absorbidas. A este respecto se prefieren de acuerdo con la invención aquellas matrices de colágeno reticuladas que pueden absorber y almacenar cantidades de líquidos de 1 a 200 veces preferentemente de 10 a 100 veces su propio peso.

Una medida para la cantidad de líquido que pueda absorberse por el material, designa el grado de hinchamiento de masa ( $Q_m$ ):

$$Q_m = \frac{m_{Gel}}{m_{tr.Pr.}}$$

5  $Q_m$  designa a este respecto la relación de la masa del material hinchado ( $m_{Gel}$ ) con respecto a la masa del material seco frente al hinchamiento  $m_{tr.Pr.}$ ).

10 Para la medición del grado de hinchamiento de masa se pesa por lo tanto el material liofilizado y a continuación se deja hinchar en una cubeta con un exceso de agua destilada con una temperatura de 15 - 25 °C colocado sobre la superficie de agua y se deja hinchar durante 10 minutos. El agua en exceso se decanta sin acción mecánica. Después de una nueva medición de peso de la composición hinchada se determina el grado de hinchamiento de masa de acuerdo con la fórmula anterior.

Las composiciones liofilizadas de acuerdo con la invención presentan preferentemente un grado de hinchamiento de masa de 15-100.

15 Es también además posible indicar el comportamiento de retención de líquido con respecto al peso de la composición. Para ello se convierte el aumento de peso determinado en la estructura de ensayo descrita anteriormente de las muestras de material hinchadas, después de decantarse el líquido en exceso, en el volumen de líquido correspondiente a este aumento de peso y se indica este volumen de líquido absorbido con respecto a 1 g de la composición utilizada.

20 Las matrices de colágeno de acuerdo con la invención se caracterizan también por una mayor densidad óptica con respecto a las matrices de colágeno no reticuladas o reticuladas únicamente de manera deshidrotérmica.

25 A este respecto la densidad óptica designa la unidad cuantitativa de densidad óptica, medida como logaritmo decimal del cociente de intensidad de luz permitida con respecto a intensidad de luz irradiada, determinado con un densitómetro Heiland SW TD 03 en matrices de colágeno de capa con un grosor de capa de 1 m. Las matrices de colágeno de acuerdo con la invención de la presente invención presentan preferentemente una densidad óptica de  $\geq 0,02$ , más preferentemente  $\geq 0,03$ , aún más preferentemente  $\geq 0,05$  por mm de grosor de capa.

30 Además de las ventajas mencionadas anteriormente que presentan las matrices de colágeno de acuerdo con la invención y que resultan de manera determinante del procedimiento de acuerdo con la invención, el material de colágeno reticulado con epóxido de acuerdo con la invención presenta con respecto al material de colágeno no reticulado o únicamente reticulado de manera deshidrotérmica, así como también con respecto a materiales de colágeno reticulados con otros agentes de reticulación químicos conocidos, en particular presentan las siguientes propiedades ventajosas:

- el material es aterciopelado, más blando, se aprecia con un grosor de capa idéntico más relleno y voluminoso que por ejemplo el material no reticulado/reticulado de manera deshidrotérmica. Esto es ventajoso en particular en el campo cosmético.
- densidad óptica mayor: de manera ventajosa en el campo de la aplicación cosmética así como para formas de realización que mejorarán las impresiones de color
- mayor fuerza recuperadora: el material reticulado no se colapsa en estado húmedo debido a efectos mecánicos tan fácilmente como por ejemplo material no reticulado/reticulado de manera deshidrotérmica y adopta más fácilmente de nuevo su volumen original, de manera similar a una esponja
- capacidad de absorción de agua mejorada
- velocidad de humectación mejorada
- alta elasticidad y flexibilidad
- capacidad de control de la colonización celular/reacción celular, (respuesta de las células al material)

50 Con respecto a la capacidad de control de la colonización celular/reacción celular a de indicarse que mediante el procedimiento de acuerdo con la invención se descubrió una posibilidad de efectuar un control dirigido de las propiedades de materiales con respecto a la rigidez y flexibilidad, capacidad de degradación enzimática (tasa de degradación) y la provisión de constituyentes peptídicos y de colágeno solubles liberables u otras proteínas de matriz y constituyentes peptídicos solubles etc. tal como se expuso anteriormente.

55 Con respecto al control de la rigidez y flexibilidad ha de indicarse que se conoce que la rigidez/flexibilidad de matrices colonizables tiene una influencia considerable sobre las propiedades de las células que se adhieren sobre las mismas. La influencia del entorno celular sobre el desarrollo del fenotipo celular y su patrón de expresión, comportamiento de migración y de proliferación se ha hecho un hueco en los últimos años cada vez más en el primer plano de la investigación pura en el campo de la ingeniería de tejidos. La rigidez (*stiffness* o *rigidity*) o elasticidad de la matriz extracelular (ECM) es junto a su composición a este respecto un aspecto principal del entorno celular respectivo.

La rigidez de la matriz extracelular es una señal de regulación para el comportamiento de las células. Por ejemplo la diferenciación de células madre depende directamente de la rigidez del sustrato, así mismo por ejemplo el comportamiento de miofibroblastos se basa en una rigidez determinada del entorno celular. Las células reaccionan directamente a la reacción mecánica ("*mechanical feedback*") de la ECM que las rodea ("*mechano-chemical sensing*").

Con respecto a la investigación de la relación entre la rigidez del material circundante celular y la respuesta celular en la que se basa se conoce como estado de la técnica el uso de geles de diferente rigidez y composición (Mih *et al.* in PLoS ONE 6 (5): e19929; 2011). Ejemplos de sustratos sintéticos son hidrogeles de poliacrilamida de diferente grado de polimerización así como multicapas de polielectrolito (PEM), así mismo se usan también geles a base de proteína tal como por ejemplo geles de colágeno (por ejemplo de acuerdo con Yang *et al.* en Biophysical Journal Vol. 97, 2051-2060; 2009). La rigidez del gel de colágeno a partir de colágeno soluble depende a este respecto directamente de la concentración de la proteína formadora de gel, y puede modificarse adicionalmente mediante una red de adición adicional por ejemplo con glutaraldehído o también genipina.

Para la cuantificación de la elasticidad sirve el denominado módulo de elasticidad (también módulo de Young) del material respectivo, E. Esto se define tal como sigue:

El módulo de elasticidad (también módulo de Young nombrado según el físico Thomas Young) es un valor característico de material de la técnica de materiales, que describe la relación entre la tensión y el alargamiento en la deformación de un cuerpo sólido con un comportamiento elástico lineal. El módulo de elasticidad se abrevia como módulo E o como fórmula con E.

La cantidad del módulo de elasticidad es tanto mayor cuanto más resistencia opone un material a su deformación. Un material con algo módulo de elasticidad es por tanto rígido, material con bajo módulo de elasticidad es flexible.

Se conoce que la rigidez de ECM en tejido sano y enfermo o dañado tiene una amplia distribución.

Por ejemplo la rigidez de tejido nervioso (cerebro) es de E= aproximadamente 2,5 kPa, la de tejido muscular es de E= 12 kPa y la de hueso es de E = 18 GPa. Para tejido de granulación, tal como se encuentra en la cicatrización, se kPa (Krishnan *et al.* in Cell Adhesion & Migration 2: 2, 83-94; 2008).

Existe un interés en proporcionar estructuras de soportes para el cultivo 3D en el campo de la biotecnología, investigación pura e ingeniería de tejidos, que además de una alta biocompatibilidad y una correspondiente estabilidad frente a la degradación también puedan presentar una rigidez específica, ajustable de manera dirigida para el tejido respectivo, de manera dirigida, para poder ofrecer a las células que van a cultivarse el entorno celular óptimo.

Las matrices de colágeno de acuerdo con la invención presentan una rigidez ajustable por medio del procedimiento de acuerdo con la invención en el intervalo de 0,01 - 100 kPa, preferentemente en el intervalo entre 0,1 y 60 kPa, de manera especialmente preferente en el intervalo entre 2 y 40 kPa.

De esta manera con el presente procedimiento para la reticulación de matrices de colágeno existe la posibilidad de adaptar las propiedades de material de manera dirigida a los requisitos para una capacidad de colonización celular óptima, diferenciación celular, en particular para el denominado perfil de expresión de las células que se encuentran en contacto directo con la matriz. El perfil de expresión designa a este respecto por ejemplo la expresión de determinadas proteínas de matriz, proteínas de citoesqueleto (actinas), citocinas, proteasas etc. Un control de este tipo de la diferenciación celular o del perfil de expresión de matrices colonizadas es ventajoso en particular en el campo de la ingeniería de tejidos y de los bioimplantes pero también en la creación de sistemas de modelo en la investigación pura, el diagnóstico y la analítica.

Debido a las propiedades ventajosas descritas anteriormente de las matrices de colágeno reticuladas de acuerdo con la invención estas son en particular adecuadas para el uso cosmético y médico, farmacéutico o biotecnológico.

Es por lo tanto objetivo de la invención también el uso cosmético de las matrices de colágeno de acuerdo con la invención, agente cosmético, en particular como capa cosmética o máscara.

A este respecto tiene lugar en particular la aplicación de una matriz de colágeno reticulada con epóxido liofilizada de acuerdo con la invención como capa cosmética o máscara de tal manera que esta se aplica seca sobre la parte del cuerpo que va a tratarse y ahí se humedece con agua o una solución acuosa de uno o varios principios activos o dado el caso o sustancias auxiliares o en la que la matriz de colágeno en forma de una capa cosmética o máscara antes de la aplicación sobre la parte del cuerpo que va a tratarse se humedece con una solución acuosa de uno o varios principios activos y/o dado el caso sustancias auxiliares.

Una aplicación seca o prehumedecida correspondiente puede tener lugar también con el uso de las matrices de colágeno de acuerdo con la invención como agente para el tratamiento de heridas.

Además la presente invención se refiere a las matrices de colágeno reticuladas con epóxido liofilizadas de acuerdo con la invención para su uso como agente farmacéutico (que comprende también productos medicinales), en particular para la aplicación tópica o dérmica o para el implante en seres humanos o animales.

- 5 En particular se prefieren las matrices de colágeno de acuerdo con la invención para el uso como implante, como agente de tratamiento de la piel dérmico o transdérmico y/o como agente para la hemostasia así como estructura de soporte para la colonización celular en el campo de la ingeniería de tejidos.

10 Además la presente invención se refiere a las matrices de colágeno de acuerdo con la invención para su uso en al menos una indicación o aplicación, que se selecciona del siguiente grupo, que se compone de: tratamiento de heridas agudas o crónicas, mejora de la cicatrización, compensación de defectos y tejido, rebasamiento de defectos de la piel profundos con estructura de volumen, soporte de la regeneración de tejidos, regeneración de la dermis, tratamiento de quemaduras, uso en la cirugía plástica, uso después de escisión de cicatrices, terapia de combinación con trasplantes de gel dividida autólogos, soporte de la formación de tejido de granulación, soporte de la angiogénesis, garantía de una mejor calidad de cicatriz, tratamiento de heridas crónicas tal como Ulcus Cruris, Dekubitus y pie diabético, tratamiento de heridas abiertas, tratamiento de trastornos de cicatrización, tratamientos de enfermedades con defectos en piel profundos, producción de un implante de mandíbula, producción de un implante óseo, producción de un implante de cartilago, producción de un implante de tejido, producción de un implante de piel, producción de una capa médica, producción de una capa transdérmica, producción de emplaste para heridas, producción de un material de vendaje para heridas, producción de una capa para heridas y producción de una matriz de cultivo celular para la multiplicación celular para el implante de unidades de matriz celular así como la biotecnología en la creación de sistema de modelos para el ajuste *in vitro* de sistemas de tejido por ejemplo modelo de tejido par la investigación pura, el diagnóstico y la analítica.

25 Además las matrices de colágeno de acuerdo con la invención pueden usarse también en una terapia de tratamiento de heridas soportada por vacío, tal como se conoce en principio por el estado de la técnica y tal como se describe por ejemplo en el documento US 2007/0027414. A este respecto las matrices de colágeno de acuerdo con la invención pueden incorporarse a un tratamiento de vacío de este tipo debido a su alta flexibilidad adecuadamente en el lecho de herida y allí debido a sus adecuadas propiedades de absorción e hidratación soportar el transporte de la secreción de herida excesiva de manera positiva. A este respecto el transporte de secreción se consigue mediante el material de matriz de colágeno permeable, poroso, formulado ya a través de su hidrofilia y capacidad de hinchamiento fundamentalmente altas. Además las matrices de colágeno de acuerdo con la invención, debido al proceso de liofilización, disponen de una alta porosidad, lo que facilita adicionalmente el paso del líquido. A este respecto es además ventajoso que las matrices de colágeno de acuerdo con la invención, en particular también debido a los constituyentes de proteína y peptídicos y de colágeno solubles que pueden liberarse contenidos en las mismas, presenten ya en sí una influencia positiva sobre el desarrollo de la cicatrización. Las matrices de colágeno de acuerdo con la invención son especialmente adecuadas para las aplicaciones anteriores en particular también debido a su alta biocompatibilidad, de manera correspondiente a la actividad residual de epóxido baja y a los constituyentes de proteína y de péptido y de colágeno solubles que pueden liberarse contenidos.

40 Para los campos de aplicación preferidos descritos anteriormente de las matrices de colágeno reticuladas de acuerdo con la invención esta se encuentran preferentemente en forma de máscaras en forma de capa, láminas, matrices, capas, almohadillas, apósitos o configuraciones planas similares. Tales formas de realización en forma de capa son adecuadas en particular para el tratamiento exterior y plano también de regiones que afectan a mayor superficie de la piel.

50 En una forma de realización posible adicional tales matrices de colágeno en forma de capa pueden estar también completamente o parcialmente laminadas o encontrarse en forma de capas de varias capas, unidas entre sí ("capa sándwich"). Como material laminado pueden usarse materiales habituales conocidos por el estado de la técnica tal como por ejemplo fibras, velos, redes, películas o láminas de materiales adecuados tal como por ejemplo rayón, celulosa, polietileno (PE) o poliuretano (PO) u otros polímeros/copolímeros sintéticos o semisintéticos, que pueden unirse firmemente con métodos convencionales por ejemplo mediante pegado laminación en caliente, reticulación etc. con los materiales de soporte en el sentido de la presente invención. Una laminación de este tipo es especialmente adecuada para aumentar adicionalmente la estabilidad mecánica de los materiales de colágeno en forma de capa de acuerdo con la invención, así como su capacidad de manipulación durante la aplicación, especialmente en estado húmedo. Una laminación preferida comprende una laminación con una capa autoadhesiva o un material de emplasto en forma de capa, que se coloca preferentemente sobre los materiales de colágeno en forma de capa de modo que la capa de laminado autoadhesiva sobresale en el borde completa o parcialmente por encima del material de colágeno, de modo que los materiales de colágeno laminados pueden fijarse fácilmente de manera similar a una disposición de emplaste convencional por medio de la laminación autoadhesiva que sobresale por el borde sobre las zonas de piel que van a tratarse. En el caso de tales materiales de colágeno laminados autoadhesivos se prefieren en particular aquellos recubrimientos de laminación autoadhesivos que disponen de una compatibilidad con la piel especialmente alta, baja tendencia a la irritación y a la alergia así como una fácil separación, para no dañar adicionalmente en la medida de los posible áreas de la piel previamente dañadas o irritadas al separar la capa adhesiva. En función del campo de aplicación deseado tales laminaciones pueden ser oclusivas, semioclusivas o hidrófilas y no oclusivas, prefiriéndose laminaciones hidrófilas, no oclusivas o como

máximo en el sentido de en todo caso aún semioclusivas, para permitir la humectación de los materiales de colágeno laminados para la aplicación. Además en el caso de la elección de tales recubrimientos de laminación adhesivos a de tenerse en cuenta que la capa adhesiva no es soluble en agua para que con la humectación del material el adhesivo no se separe y por lo tanto no se pierda el efecto de pegado o de fijación.

Por lo tanto la presente invención comprende en particular también aquellos materiales de colágeno reticulados en forma de capa, que están dotados completa o parcialmente de una capa adicional seleccionada de fibras, velos, redes, películas o lámina o de una capa autoadhesiva que está aplicada sobre el material de colágeno en forma de capa de tal manera que sobresale con la misma por el borde cerrando o por el borde completamente o parcialmente por encima del material de colágeno.

Tal como se expuso anteriormente las matrices de colágeno de acuerdo con la invención pueden humedecerse previamente o rehidratarse tanto antes de la aplicación cosmética como también de la aplicación médica. Una humectación de este tipo o rehidratación tiene lugar preferentemente con una solución acuosa que se selecciona del grupo que comprende agua así como dado el caso agua desmineralizada o la denominada agua termal, disoluciones fisiológicas así como disoluciones acuosas que contienen al menos un principio activo o sustancia auxiliar. Las disoluciones acuosas usadas para la humectación o rehidratación se denominan como disoluciones de activador.

En el caso de tales disoluciones de activador puede tratarse por ejemplo de disoluciones de principios activos y/o sustancias auxiliares volátiles, que debido al procedimiento de producción por ejemplo mediante la liofilización, no se introducen o pueden introducirse en un material liofilizado tal como por ejemplo ciertos porcentajes de aceites etéreos, perfumes etc. También pueden estar contenidos tales principios activos y sustancias auxiliares que consiguen un efecto de humectación adicional y el efecto de humectación de los mismos o debido a tendencias a higroscopia no o solo en pequeñas medidas pueden incorporarse en las matrices de colágeno liofilizadas de acuerdo con la invención, dado que de esta manera o bien ya no puede mantenerse la estabilidad del material de colágeno liofilizado en sí o bien la estabilidad de principios activos estables frente a la humedad eventualmente contenidos.

En principio en las disoluciones de activador pueden estar contenidos uno o varios de los principios activos y sustancias auxiliares mencionadas anteriormente. En particular son adecuados especialmente disoluciones de principio activo que contienen uno o varios de los principios activos o sustancias auxiliares preferidos mencionados anteriormente para la aplicación terapéutica en indicaciones preferidas de acuerdo con la invención.

En una forma de realización especialmente preferida se usa una solución de activador acuosa, que es esencialmente libre de sustancias conservantes y/o de sustancias auxiliares del grupo de los poliéteres, polietilenglicoles (PEG), polipropilenglicoles (PPG) y poliglicoles (PG).

En una forma de realización preferida adicional de la invención el material de colágeno reticulado con epóxido de acuerdo con la invención se encuentra con la solución de activador en una disposición espacial (preparado de combinación, paquete de aplicación, kit de partes etc.). Los preparados de combinación de este tipo o kit de partes, disposiciones comprenden preferentemente al menos una de las matrices de colágeno de acuerdo con la invención preferentemente aquellas en forma de capas en formad de capa, almohadillas o máscaras, así como al menos una solución acuosa que puede contener uno o varios principios activos y al menos una o varias sustancias auxiliares (solución de activador).

La configuración de tales preparaciones de combinación o combinaciones de kit de partes a partir del material de colágeno de acuerdo con la invención por un lado y solución de activador por otro lado puede prever a este respecto que los dos constituyentes se tomen por separado de la disposición de kits de partes y fuera del mismo se reúna para el uso adicional. Sin embargo puede concebirse también que una reunión de los componentes dentro del envase de kits de partes por ejemplo en cámaras previsto para ello, incluso tenga lugar y la composición rehidratada se conduzca entonces a partir de esta directamente al uso adicional exterior o transdérmico. Esto puede llevarse a cabo preferentemente de manera directa por el usuario final.

La invención se explica en detalle mediante los siguientes ejemplos.

## **Ejemplos**

### Ejemplo 1:

Ejemplo de producción 1 a

Matriz de colágeno pura con reticulación de epóxido (5 % de agente de reticulación de epóxido/masa seca)

Ejemplo para la producción de una biomatriz de colágeno reticulada con epoxi de acuerdo con la invención sin adición de otros constituyentes peptídicos o proteicos solubles, principios activos y/o sustancias auxiliares con el uso de una cantidad de agente de reticulación de epóxido del 5 % con respecto a la masa seca de la suspensión de colágeno.

- 5 a) Proporcionar 3000 g de una suspensión de colágeno (contenido seco de colágeno: 1,6 %, contenido de colágeno: 48 g), producida de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con el documento DE 4048622 A1 y en particular el documento DE 10350654 A1
- 5 b) Ajustar el valor de pH de la suspensión de colágeno a pH 3,3.
- c) (eliminada)
- 10 d) A una temperatura por debajo de 10 °C se mezcla la suspensión de colágeno con agitación con un agitador de palas (eurostar, IKA) a 600 rpm en el plazo de 5 minutos gota a gota con 2,4 g de 1,4-butanodioldiglicidil éter (BDDGE, Sigma-Aldrich). La masa obtenida se desgasifica en un aparato de mezclado de vacío (Smartmix, Amann/Girrbach) en porciones de aproximadamente 750 g.
- 10 e) La suspensión desgasificada, en el plazo de 2 h después de añadir el agente de reticulación, se vierte en placas y se congela, manteniéndose la suspensión de colágeno hasta la congelación además a una temperatura < 18 °C.
- 15 f) A continuación se almacena la masa congelada durante 24 horas a -20 °C y a continuación se somete a una liofilización, manteniéndose la temperatura de liofilización por debajo de 100 °C.
- 15 g) La matriz de colágeno liofilizada se rehumedece a una humedad del aire del 60 - 70 % de humedad relativa del aire a lo largo de 24 - 48 horas hasta un contenido de humedad hasta el 25 %, con respecto a la matriz de colágeno seca.
- 20 h) La matriz de colágeno así obtenida se corta en capas de 1-2 mm, se confecciona y opcionalmente se esteriliza por gamma (20 kGy).

Ejemplo de producción 1 b

Matriz de colágeno pura con reticulación de epóxido (10 % de agente de reticulación de epóxido/masa seca)

25 Ejemplo para la producción de una biomatriz de colágeno reticulada con epoxi de acuerdo con la invención sin adición de otros constituyentes peptídicos o proteicos solubles, principios activos y/o sustancias auxiliares con el uso de una cantidad de agente de reticulación de epóxido del 10 % con respecto a la masa seca de la suspensión de colágeno.

30 La producción tiene lugar de manera análoga al ejemplo de producción 1a, en el que en la etapa d) se añaden 4,8 g de 1,4-butanodioldiglicidil éter (BDDGE, Sigma-Aldrich) y en la etapa g) tiene lugar la rehumectación durante hasta 96 horas.

35 Ejemplo 2:

Ejemplo de producción 2a

40 Matriz de colágeno reticulada con epóxido con constituyentes proteicos solubles adicionales del grupo de las proteínas de matriz (hidrolizado de elastina)

(5 % de agente de reticulación de epóxido/masa seca)

45 Ejemplo para la producción de una biomatriz de colágeno reticulada con epoxi de acuerdo con la invención con adición de otros constituyentes proteicos/peptídicos solubles (proteínas de matriz; elastina) con el uso de una cantidad de agente de reticulación de epóxido del 5 % con respecto a la masa seca de la suspensión acuosa de colágeno,

50 a) proporcionar 3000 g de una suspensión de colágeno (contenido seco de colágeno: 1,6 %, contenido de colágeno: 48 g), producida de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con el documento DE 4048622 A1 y en particular el documento DE 10350654 A1

b) Ajustar el valor de pH de la suspensión de colágeno a pH 3,3.

55 c) A una temperatura por debajo de 10 °C se mezcla la suspensión de colágeno con agitación con un agitador de palas (eurostar, IKA) a 550 rpm en el plazo de 5 minutos gota a gota con 2,4 g de 1,4-butanodioldiglicidil éter (BDDGE, Sigma-Aldrich).

d) A continuación adición de 30 g de hidrolizado de elastina (elastina en especial B1N, empresa GfN, producción de extractos naturales GmbH) en las mismas condiciones. La masa obtenida (mezcla acuosa de colágeno) se desgasifica en un aparato de mezclado de vacío (Smartmix, Amann/Girrbach) en porciones de aproximadamente 750 g a lo largo 2x 5 min,

60 e) La mezcla de colágeno desgasificada, en el plazo de 2 h después de añadir el agente de reticulación y el hidrolizado de elastina se vierte en placas y se congela, manteniéndose la mezcla de colágeno hasta la congelación además a una temperatura < 10 °C.

f) A continuación se almacena la masa congelada durante 24 horas a -20 °C y a continuación se somete a una liofilización, manteniéndose la temperatura de liofilización por debajo de 100 °C.

65 g) La matriz de colágeno liofilizada se rehumedece a una humedad del aire del 60 - 70 % de humedad relativa del aire a lo largo de 24 - 48 horas hasta un contenido de humedad hasta el 25 %, con respecto a la matriz de

colágeno seca.

h) La matriz de colágeno así obtenida se corta en capas de 1-2 mm, se confecciona y opcionalmente se esteriliza por gamma (20 kGy).

5 Ejemplo de producción 2b

Matriz de colágeno reticulada con epóxido con constituyentes proteicos solubles adicionales del grupo de las proteínas de matriz (hidrolizado de elastina)

10 (10 % de agente de reticulación de epóxido/masa seca)

15 Ejemplo para la producción de una biomatriz de colágeno reticulada con epoxi de acuerdo con la invención con adición de otros constituyentes proteicos/peptídicos solubles (proteínas de matriz; elastina) con el uso de una cantidad de agente de reticulación de epóxido del 10 % con respecto a la masa seca de la suspensión acuosa de colágeno.

20 La producción tiene lugar de manera análoga al ejemplo de producción 2a, en el que en la etapa c) se añaden 4,8 g de 1,4-butanodioldiglicidil éter (BDDGE, Sigma-Aldrich) y en la etapa g) tiene lugar la rehumectación durante hasta 96 horas.

Ejemplo 3:

25 Ejemplo de producción 3 matriz de colágeno reticulada con epóxido con principios activos/sustancias auxiliares adicionales del grupo de las grasas y aceites cosméticos (triglicéridos / aceite neutro)

(4,8 % de agente de reticulación de epóxido/masa seca)

30 Ejemplo para la producción de una biomatriz de colágeno reticulada con epoxi de acuerdo con la invención con adición de otros principios activos/sustancias activas del grupo de las grasas y aceites (triglicéridos / aceite neutro) con el uso de una cantidad de agente de reticulación de epóxido del 4,8 % con respecto a la masa seca de la suspensión acuosa de colágeno.

35 a) proporcionar 3900 g de una suspensión de colágeno (contenido seco de colágeno: 1,6 %, contenido de colágeno: 62,4 g), producida de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con el documento DE 4048622 A1 y en particular el documento DE 10350654 A1

b) Ajustar el valor de pH de la suspensión de colágeno a pH 3,3.

40 c) A una temperatura por debajo de 10 °C se mezcla la suspensión de colágeno con agitación con un agitador de palas (eurostar, IKA) a 550 rpm en el plazo de 5 minutos gota a gota con 2,95 g de 1,4-butanodioldiglicidil éter (BDDGE, Sigma-Aldrich).

d) A continuación adición de 3,8 g de aceites neutros en las mismas condiciones, la masa obtenida (mezcla acuosa de colágeno) se desgasifica en un aparato de mezclado de vacío (Smartmix, Amann/Girrbach) en porciones de aproximadamente 750 g a lo largo 2x 5 min.

45 e) La mezcla de colágeno desgasificada, en el plazo de 2 h después de añadir el agente de reticulación y el aceite neutro se vierte en placas y se congela, manteniéndose la mezcla de colágeno hasta la congelación además a una temperatura < 10 °C.

f) A continuación se almacena la masa congelada durante 24 horas a -20 °C y a continuación se somete a una liofilización, manteniéndose la temperatura de liofilización por debajo de 100 °C.

50 g) La matriz de colágeno liofilizada se rehumedece a una humedad del aire del 60 - 70 % de humedad relativa del aire a lo largo de 24 - 48 horas hasta un contenido de humedad hasta el 25 %, con respecto a la matriz de colágeno seca.

h) La matriz de colágeno así obtenida se corta en capas de 1-2 mm, se confecciona y opcionalmente se esteriliza por gamma (20 kGy).

Ejemplo 4:

55 Determinación cualitativa de proteínas solubles por medio de SDS-PAGE

Breve explicación: SDS-PAGE

60 SDS = Dodecil sulfato de sodio, detergente, sal de sodio de un ácido graso de cadena larga

PAGE = electroforesis en gel de poli(acrilamida), electroforesis en un gel polimérico de acrilamida

65 Electroforesis: separación de partículas cargadas en una sustancia de soporte mediante aplicación de una tensión eléctrica, que tiene como consecuencia una migración de las partículas

Breve descripción: Mediante adición de detergentes iónicos a pH > 7 se separan de las proteínas no cargadas,

partículas cargadas, que se separan en un gel mediante aplicación de una tensión eléctrica en el campo eléctrico resultante de ello por medio de su tamaño y forma a lo largo de un tramo de migración. Las proteínas de poca masa migran más rápidamente que las proteínas grandes con mayor masa. Las proteínas esféricas migran más rápidamente que las proteínas alargadas, filamentosas. Los grupos de proteína separados según el tamaño forman en gel tiras estrechas (denominadas bandas), que pueden hacerse visibles con colorantes. El tamaño de proteínas o fragmentos de proteína se evalúa visualmente por medio de su tramo de migración en comparación con las sustancias de referencia (patrón de peso molecular = proteínas de tamaño conocido).

Sistemas de ensayo adecuados son sistemas de ensayo estándar que se encuentran comercialmente disponibles convencionales tal como por ejemplo el sistema Criterion de la empresa Biorad:

Criterion XT Precast Gel 4-12 % de acrilamida,  
sistema tampón: Bis-Tris, 1 2+2 Well Comb, 45  $\mu$ l por pocillo  
grosor de gel: 1 mm, Catálogo 345-0123 empresa Bio Rad  
tampón B: Criterion XT Mes (Buffer, 20x) Control 210007145  
Tampón de muestra: XT Sample Buffer; 4x, 10 ml de Control 310008088

La coloración de los geles de proteína acabados se consigue mediante el reactivo acabado GeiCode Blue Safe Stain (Thermo Scientific), que se basa en el colorante sensible a proteína azul de Coomassie.

#### Ejemplo 5:

Determinación cuantitativa de constituyentes proteicos solubles por medio del método BCA

La detección de proteínas solubles y constituyentes proteicos solubles por medio de ensayo de BCA se basa en que proteínas con iones  $\text{Cu}_2^+$  forman en solución alcalina un complejo (reacción de Biuret). Los iones  $\text{Cu}_2^+$  de este complejo se reducen a iones  $\text{Cu}^+$ , que con ácido bicinconónico (BCA) forman un complejo de color violeta. La absorción de este complejo de color se mide mediante espectrometría a 562 nm. La reducción tiene lugar mediante las cadenas laterales de cisteína, tirosina, triptófano y el enlace peptídico, dependiendo la intensidad de la formación de colorante (el comportamiento redox de los grupos implicados), entre otras cosas, de la temperatura, de modo que mediante su variación puede modificarse la sensibilidad del ensayo.

Sistemas de ensayo adecuados son sistemas de ensayo estándar que se encuentran comercialmente disponibles convencionales tal como por ejemplo el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific).

La determinación tiene lugar en comparación con una solución patrón de BSA (*Bovine Serum Albumin*).  
Condiciones de reacción para el desarrollo de color: 60  $^{\circ}\text{C}$ , 1 h de tiempo de reacción.

Resultados de ensayo:

La Figura 1 muestra la fracción porcentual de constituyentes proteicos solubles en una matriz de colágeno reticulada con epoxi con proteínas de matriz solubles (hidrolizado de elastina), de manera correspondiente a la composición de acuerdo con el Ejemplo de producción 2a y 2b, que se reticularon con concentraciones de epóxido del 5 % y el 10 %, en cada caso con respecto a la masa seca de la suspensión de colágeno, en comparación con una matriz de colágeno reticulada exclusivamente de manera deshidrotérmica con hidrolizado de elastina (100 %). (en la Figura denominado a este respecto "no reticulada" una matriz de colágeno reticulada de manera deshidrotérmica (es decir no reticulada químicamente)). A partir de ahí se muestra claramente que, a pesar de la reticulación química, permanece en el material un alto porcentaje de constituyentes proteicos y proteínas de matriz solubles. La medición mostró además para los materiales sometidos a ensayo los siguientes porcentajes en peso de constituyentes proteicos solubles, en cada caso con respecto al producto final liofilizado:

Matriz de colágeno reticulada de manera deshidrotérmica con elastina ("no reticulada"): > 15 % en peso  
Ejemplo de producción 2a con 5 % de epóxido: > 10 % en peso  
Ejemplo de producción 2b con 10 % de epóxido: > 4 % en peso.

#### Ejemplo 6:

Determinación de la tasa de degradación

Ensayo de digestión con colagenasa

La determinación de la estabilidad enzimática (estabilidad frente a la degradación) de matrices de colágeno tiene lugar por medio de un método que se basa en la descomposición de las fibras de colágeno por la enzima colagenasa. A este respecto la descomposición de las fibras y fibrillas de colágeno se provoca de manera dirigida mediante la enzima colagenasa (colagenasa de *Clostridium histolyticum* (tipo 1) en tampón PBS (*Phosphate Buffered Saline*) en condiciones controladas y después de una duración de reacción definida se determina por medio

## ES 2 543 103 T3

de medición UV/VIS en un fotómetro espectral el porcentaje de productos de descomposición.

### Productos químicos usados:

- 5 - Solución tampón TRIS: base TRIZMA (Fluka N° de art. 93350 lote 450756/1),  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Riedel de Haen N° de art. 12074 lote 1 2610),
- HCl al 25 % (Merck N° de art. 1.00316.1000 lote Z73081 6335)
- solución de EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, sal de disodio dihidratada 0,2 mol/l (Fluka N° de art. 03679 lote 1104109 10505293)
- 10 - colagenasa: Sigma C 688T lote 122k8607, 700 U/mg
- matrices de colágeno: por ejemplo de acuerdo con el ejemplo de producción 1 a 3

### Producción de los reactivos:

15 Solución tampón TRIS 0,1 M/  $\text{CaCl}_2$  25 mM:

1,21 g de base TRIZMA se disuelven junto con 0,55 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 80 ml de agua RO y se ajusta con aproximadamente 1 ml de 25 % HCl a un valor de pH de 7,4, a continuación se transfiere la solución a un matraz de medición de 100 ml y se rellena con agua RO.

20 Solución de EDTA 0,2 mol/l:

Se disuelven 3,7224 g de ácido etilendiaminotetraacético, sal de disodio dihidratada en 50 ml de agua RO (en el agitador magnético aproximadamente 30 min).

25 Solución enzimática:

5 mg de la enzima se disuelven en 1 ml de solución tampón TRIS. Para los ensayos individuales se alimentan alícuotas de 50 o 100 U (volumen dependiente de carga, en este caso = 35 o 70  $\mu\text{l}$ ) al sistema de ensayo,

30 Ácido acético al 0,95 %:

Se rellenan 0,95 ml de ácido acético glacial con agua RO hasta 1000 ml.

35 Realización:

A partir de láminas de colágeno de 2 mm de grosor se estampan piezas con un radio de 10 mm (peso seco aproximadamente 15 mg) y se secan durante 12 horas en el desecador. Las muestras se pesan en recipientes Eppendorf de 2 ml (Safe Lock Tubes 0030.120.094) y se mezclan con 1,5 ml de solución tampón TRIS. En cuanto ha tenido lugar la adición de 35  $\mu\text{l}$  de solución de enzima, se templan las muestras a 37 °C en el Thermoblock (Stuart Scientific Block Heater).

45 Después del tiempo de digestión correspondiente (1,5 horas, 3 horas, 6 horas, y 23 horas) se mezclan los recipientes Eppendorf con 200  $\mu\text{l}$  de solución de EDTA y se centrifugan durante 40 min con potencia máxima a 18 °C. Para la dilución con 7,5 ml de ácido acético al 0,95 % se transfieren alícuotas de 800  $\mu\text{l}$  en tubos de ensayo esmerilados normalizados de 10 ml, se cierran con un tapón y se voltean para la homogeneización.

### Medición fotométrica:

50 La medición tiene lugar en el fotómetro espectral UV/VIS a una longitud de onda de 234 nm. Se usan cubetas de cuarzo de 10 mm. Como valor vacío se miden 7,5 ml ácido acético con 800  $\mu\text{l}$  de solución tampón TRIS. Antes de medirse las muestras se medirá como valor cero una solución de enzima correspondiente (en este caso: 35  $\mu\text{l}$  de solución de enzima. En 1,5 ml de tampón TRIS en el recipiente Eppendorf, de los 800  $\mu\text{l}$  en 7,5 ml de ácido acético), cuya absorción se representa como punto cero en la gráfica (absorción aproximadamente 0,0166).

55 Para la determinación de los valores absolutos se crea además según las instrucciones anteriores, una solución de calibración y se mide.

60 Producción de la solución de calibración:

0,1006 g de colágeno se descompusieron por completo en 8 ml de tampón TRIS con 233  $\mu\text{l}$  de solución de colagenasa (de manera correspondiente 600 U) durante la noche a 37 °C. Esta solución se mezcló al día siguiente con 1333 ml de solución de EDTA y se relleno en el matraz de medición con tampón TRIS hasta 10 ml. De esta solución se diluyeron volúmenes correspondientes según la siguiente tabla con ácido acético al 0,95 % hasta 10 ml y se midió la absorción de esta solución a 234 nm.

Solución de colágeno al 1 % [ml/10 ml]	Masa del producto de descomposición de colágeno en g	Concentración de colágeno [ $\square$ g/ml]	A (234 nm) (MW; n=2)
0	0	0	-0,0146
0,3	0,0003	300	0,2782
0,6	0,0006	600	0,6095
0,9	0,0009	900	0,9754
1,2	0,0012	1200	1,3254

La línea de calibración correspondiente tiene la ecuación lineal  $A(234\text{ nm}) = 0,0011c - 0,0407$  ( $R^2=0,9983$ ).

**Resultados de ensayo:**

5 La Figura 2a muestra las tasas de degradación relativas (%) de una matriz de colágeno reticulada con epoxi sin sustancias contenidas adicionales de acuerdo con el ejemplo de producción 1a así como de una matriz de colágeno reticulada con epoxi con proteínas de matriz solubles adicionales (hidrolizado de elastina) de acuerdo con el ejemplo de producción 2a (concentración de epóxido en cada caso del 5 %) en comparación con una matriz de colágeno reticulada exclusivamente de manera deshidrotérmica con hidrolizado de elastina. (En la Figura, a este respecto “no reticulada” designa una matriz de colágeno reticulada de manera deshidrotérmica (es decir no reticulada químicamente)).

15 La Figura muestra claramente la mejora de la degradación en el sentido de una reducción de la tasa de degradación (reducción de la descomposición enzimática) de los materiales de colágeno de acuerdo con la invención reticulados con epóxido.

20 En este caso se situó la matriz completamente disuelta después de 6 horas como el 100 %, Los valores de absorción se normalizaron con respecto a 10 mg de matriz.

A través de la determinación de la recta de calibración pueden calcularse a partir de los valores de absorción los valores absolutos de las cantidades disueltas:

Concentración de la matriz disuelta en mg/ml o degradación en %	t=0	t=1,5 h	t=3 h	t=6 h	t=23 h
No reticulada	0 0 %	9,37 93,7 %	10 100 %	10 100 %	10 100 %
Ejemplo 1a	0 0 %	2,64 26,4 %	4,18 47,8 %	4,45 44,5 %	7,64 76,4 %
Ejemplo 2a	0 0 %	5,88 58,8 %	6,84 68,4 %	7,09 70,9 %	8,73 87,3 %

25 La Figura 2b muestra las concentraciones absolutas correspondientes de la matriz disuelta normalizadas con respecto a 10 mg de matriz utilizada a lo largo de un periodo de tiempo de hasta 23 horas.

30 La Figura 2b muestra además el desarrollo de la degradación a lo largo de un periodo de tiempo de hasta 23 horas como fracción de porcentaje de la degradación. Después, muestran las matrices de colágeno reticuladas de acuerdo con la invención también después de 23 horas de digestión con colagenasa aún una estabilidad claramente mejor frente a la degradación que una matriz químicamente no reticulada.

**Ejemplo 7:**

**35 Determinación de la estabilidad frente a la hidrólisis**

El examen de la estabilidad frente a la hidrólisis de matrices de colágeno tiene lugar mediante introducción de un material de colágeno definido en una solución acuosa y almacenamiento a 50 °C y determinación de la variación de las propiedades de material a lo largo del tiempo.

40 Una solución acuosa a modo de ejemplo para examinar la estabilidad frente a la hidrólisis presenta la siguiente composición:

	Fabricante	Porcentaje (%)
Glicerol	Merck	2,50
1,5-pentanodiol	Merck	2,40
Rokonsal MEP	ISP	0,250
Cloruro de sodio	AppliChem	0,10

Agua purísima		94,75
---------------	--	-------

Producción:

- 1) Disolver glicerol, pentanodiol y Rokonsal MEP en vaso de precipitados sobre agitador magnético
- 2) rellenar con agua purísima (SHC 101) con agitación hasta aproximadamente el 98 % de la cantidad final
- 3) añadir NaCl y disolver sobre agitador magnético
- 4) ajustar el valor de pH con solución de ácido cítrico al 1 % a pH 5,0
- 5) rellenar con agua purísima (SHC 101) hasta la cantidad final
- 6) controlar el valor de pH y eventualmente ajustar de nuevo a pH 5,0

La estabilidad frente a la hidrólisis puede determinarse por un lado mediante medición de la reducción de superficie, debida a la contracción de las matrices.

Además, la estabilidad frente a la hidrólisis puede determinarse mediante la disminución de masa según:

$$\text{Estabilidad frente a la hidrólisis (\%)} = M_{tx} \times 100 / M_{t0}$$

Con  $M_{tx}$  = masa del material de matriz intacto / relacionado seco

$M_{t0}$  = masa del material de matriz seco antes del comienzo del ensayo

### Resultados de ensayo:

Se examinó la estabilidad frente a la hidrólisis en las condiciones descritas anteriormente por medio de la determinación de la Reducción de superficie de

- a) matriz de colágeno reticulada de manera deshidrotérmica ("no reticulada") que contiene triglicéridos/aceite neutro, que se liofilizó a una temperatura de liofilización > 120 °C.
- b) matriz de colágeno reticulada con epoxi de acuerdo con la invención de acuerdo con el ejemplo de producción 3 (que contiene triglicéridos/aceite neutro) así como
- c) matriz de colágeno reticulada con epoxi (5 % de epóxido/TM) de manera correspondiente a la composición según el ejemplo de producción 3 (que contiene triglicéridos/aceite neutro), que se liofilizó a una temperatura de liofilización > 120 °C.

La Figura 3 muestra que materiales de colágeno reticulados únicamente de manera deshidrotérmica ("no reticulados") de acuerdo con a) en las condiciones de ensayo seleccionadas después de 5 días muestran ya una hidrólisis completa (resolución estructural de la estructura de matriz), mientras que en el caso de los materiales de colágeno reticulados con epoxi de acuerdo con la invención de acuerdo con b) en las mismas condiciones después de 18 días no se observan todavía ninguna variación estructural de la matriz. Los materiales de colágeno reticulados con epoxi que se secaron a temperaturas de liofilización > 100 °C de acuerdo con c) muestran, con respecto a los materiales de acuerdo con la invención según b) en el mismo instante, una hidrólisis incipiente (contracción de superficie). Después de aproximadamente 4 semanas, también una matriz de acuerdo con la invención muestra según b) una hidrólisis incipiente, mostrando los materiales más secados de acuerdo con c) en este instante una estabilidad frente a la hidrólisis claramente peor. Los resultados reflejan en este caso también la influencia de la temperatura de liofilización sobre la estabilidad frente a la hidrólisis. Después, las matrices que se sometieron a una temperatura de liofilización > 100 °C, presentan una estabilidad frente a la hidrólisis peor con respecto a los materiales producidos de acuerdo con la invención (temperatura de liofilización < 100 °C).

A modo de ejemplo, la Figura 4 ilustra el grado de hidrólisis de una matriz reticulada de manera deshidrotérmica de acuerdo con a) en comparación con una matriz de acuerdo con la invención de acuerdo con b) después de 18 días de almacenamiento en las condiciones de ensayo descritas anteriormente.

### Ejemplo 8:

#### Determinación de la resistencia a la rotura por tracción en húmedo, método interno (UV8801)

En el caso del método para la determinación de la resistencia a la rotura por tracción por medio de matriz (método de medición interno UV8801) se presiona contra matrices de colágeno de acuerdo con la invención con ayuda de un aparato de ensayo mecánico (aparato de ensayo de materiales Zwick B Z 2,5 / TN 1 S), una matriz de metal con cabeza esférica (25 mm de diámetro) sobre una forma de realización en forma de capas de las matrices de colágeno y se representa el recorrido y la fuerza que recorre o ejerce la matriz.

Para la determinación se corta una matriz de colágeno en forma de capas con un grosor de 1,5 mm a un tamaño de 8 x 8 cm y se introduce en el alojamiento de muestras del aparato y en el mismo se humedece por completo. A continuación se inicia la medición y se presiona la matriz esférica sobre la muestra, hasta que se produce una rotura del material.

5 La fuerza, a la que se produce una fisura del material, se representa, se calcula y se expone por medio de representación electrónica de datos.

### Resultados de ensayo:

10 A modo de ejemplo la Figura 5 muestra la mejora de la resistencia a la rotura por tracción en húmedo (de acuerdo con el método interno UV8801) de matrices de colágeno reticuladas con epoxi con una composición de acuerdo con el ejemplo de producción 1a en comparación con matrices de colágeno reticuladas únicamente de manera deshidrotérmica (no reticuladas, secado 100 °C, designando "no reticuladas" reticuladas únicamente de manera deshidrotérmica (es decir no reticuladas químicamente).

15 La Figura 5 muestra también la influencia de la temperatura de liofilización sobre la resistencia a la rotura por tracción en húmedo. Después matrices, que se expusieron a una temperatura de liofilización  $\geq 100$  °C o a un secado posterior a  $> 100$  °C presentan peores resistencias a la rotura por tracción en húmedo que los materiales producidos de acuerdo con la invención.

20 Además, la Figura 6 ilustra además la influencia de la concentración de agente reticulante de epóxido sobre la resistencia a la rotura por tracción en húmedo. A este respecto se muestra que con el aumento de la concentración de epóxido  $> 5$  % (en TM de la suspensión/mezcla acuosa de colágeno) disminuye la resistencia a la rotura por tracción en húmedo. Resistencias a la rotura por tracción en húmedo óptimas se consiguen en las condiciones de procedimiento dadas con concentraciones de epóxido del 5 % al 10 % (TM). La Figura muestra además el aumento según lo esperado de la resistencia a la rotura por tracción en húmedo de materiales de colágeno reticulados únicamente de manera deshidrotérmica con aumento de la temperatura de liofilización.

25 La Figura 7 ilustra la influencia de los tiempos de permanencia y la temperatura mantenida en este caso de la suspensión/mezcla acuosa de colágeno antes de la congelación sobre la resistencia a la rotura por tracción en húmedo. A partir de esto se demuestra que tanto tiempos de permanencia más largos como temperaturas más altas repercuten de manera desventajosa sobre la resistencia a la rotura por tracción en húmedo de los materiales de colágeno.

30 A este respecto todos los materiales de matriz reticulados con epoxi sometidos a ensayo mostraron resistencias a la rotura por tracción en húmedo de  $> 400$  cN/mm de grosor de capa.

35 El material reticulado de manera deshidrotérmica presentaba una resistencia a la rotura por tracción en húmedo de  $< 200$  cN/mm de grosor de capa.

### Ejemplo 9:

#### Detección de compuestos de epoxi reactivos

#### 45 Determinación de la actividad residual de epoxi (ensayo NBP)

La determinación de la actividad residual de epoxi puede tener lugar por medio de un ensayo de NBP modificado (ensayos de nitrobenzil-piridina), basado en "Detection of Epoxides with 4-(p-Nitrobenzyl)pyridine" de Agarwal et al. (1979) Bull. Environm. Contam. Toxicol. 23, p. 825-829, modificado según Zocher et al. (2000) "Epoxide hydrolase activity of Streptomyces strains" J. Biotechnol. Feb 17; 77(2-3), p. 287-92.

#### 1. Principio

55 El procedimiento de prueba se emplea para la determinación cuantitativa de compuestos de epoxi solubles, reactivos en el producto final liofilizado en el caso de biomatrices estabilizadas con epóxidos.

p-Nitrobenzilpiridina reacciona con compuestos de alquilación (entre otros, epóxidos) para dar una sal incolora, escasamente soluble, que al reaccionar con una base se desprotona dando un colorante azul, escasamente soluble. La intensidad de color puede detectarse mediante espectrometría a una longitud de onda de 570 nm.

#### 2. Reactivos / productos químicos

65 para-Nitrobenzilpiridina (NBP) (Merck, para síntesis Synthese)  
Etilenglicol (Fluka, puro)  
Acetona (Fluka, para espectroscopía UV)

Trietilamina (Fluka, puro)  
 1,4-Butanodiol diglicidil éter o BDDG o epóxido (Sigma Aldrich, puro)  
 agua RO  
 producido a partir de ahí:

- 5 solución de sustrato: disolver 1 g de NBP en 5 ml de etilenglicol y 1,25 ml de acetona a 50 °C (suficiente para 10 muestras)  
 solución de base: 50 % de trietilamina en acetona (v/v) (suficiente para 10 muestras)

10 **3. Aparatos**

- 15 Tubo de ensayo con esmerilado, tapón esmerilado, pinza esmerilada o frasco de laboratorio de 50 ml con tapa roscada  
 estufa calefactora y bloque de calentamiento (50 °C)  
 recipientes de reacción de 2 ml con cierre de seguridad o cierre roscado  
 micropipetas para 200 µl y 1000 µl (Eppendorf), puntas de pipetas adaptadas  
 espectrómetro UV (570 nm)  
 cubetas de plástico de un solo uso de 1,5 ml (Plastikbrand, N° 7591 50)

20 **4. Muestras**

- 25 Estampado (1 2 mm) del material de colágeno que va a examinarse, por muestra (preparación de tres veces) 1-3 estampados  
 Muestra comparativa: biomatriz liofilizada sin reticulantes químicos (por ejemplo únicamente matriz de colágeno reticulada de manera deshidrotérmica)

**5. Realización**

- 30 Solución de sustrato:  
 Para en cada caso 10 muestras se pesa 1 g de NBP en un tubo de ensayo con esmerilado y se mezcla con 5 ml de etilenglicol y 1,25 ml de acetona. En el caso de un mayor número de muestras se cuadruplica la cantidad de manera correspondiente y se usa un frasco de tapa roscada.

- 35 Después del cierre cuidadoso (tapón esmerilado/pinza esmerilada o tapa roscada) se calienta la mezcla de sustrato en una estufa calefactora a aproximadamente 50 °C bajo oscilación ocasional, hasta que el sólido se ha disuelto por completo (1/2 - 1 h). Después se enfría la solución de sustrato hasta temperatura ambiente. La sal permanece disuelta a este respecto.

- 40 Solución de base:  
 Cerrar y mezclar 3 ml de trietilamina y 3 ml de acetona en el tubo de ensayo con esmerilado.

- 45 Preparación de las muestras patrón para la recta de calibración:

- Dilución previa:  
 1 g de epóxido se pesa directamente sobre 0,001 g exactamente en un matraz de medición de 100 ml por medio de una pipeta Pasteur (vidrio), se rellena con agua RO hasta 100 ml y se mezcla minuciosamente (1 : 100).

- 50 De la dilución previa se transfieren con la pipeta de 1000 µl exactamente 1000 µl a un matraz de medición de 100 ml, se rellena hasta 100 ml y se mezcla minuciosamente. Esta es la dilución de epóxido (1:10.000) para la generación de los valores de medición patrón (recta de calibración)

- 55 Valores de medición convencionales:

- 60 Añadir igual cantidad de estampado de 12 mm del material comparativo (sin reticulante) en un recipiente de reacción de 2 ml, etiquetar los recipientes de reacción. Con el uso de la pipeta de 200 µl adición en cada caso de diferentes volúmenes de agua RO sobre el velo (volumen, véase la fila A, tabla 1), a continuación adición de 600 µl de solución de sustrato.

Tabla 1 Valores de medición convencionales

	Cantidad de epóxido (nmol)	0	12,5	25	50	75
A	Volumen de agua RO (ml)	200	175	150	100	50
B	Volumen de dilución de epóxido (ml)	0	25	50	100	150

Como última adición, sólo tras terminarse las muestras de examen, adición de la dilución de epóxido 1 : 10.000

(Volumen véase la fila B, Tabla 1) con respecto a la serie patrón en el recipiente de reacción. A su vez oscilación breve.

Material de examen:

5 1-3 estampados de 1 2 mm del material que va a examinarse se pesan exactamente en la preparación de tres veces en recipientes de reacción de 2 ml sobre 0,1 mg y se humedecen con 200  $\mu$ l de agua RO. Después tiene lugar la adición de 600  $\mu$ l de solución de sustrato a los estampados humedecidos.

10 Múltiples sacudidas suaves de los recipientes de reacción hasta que se aclara la suspensión turbia en un principio. Cuando la solución de reacción se encuentra bajo la tapa, devolver mediante centrifugación breve el líquido de vuelta al fondo.

15 Incubar todas las muestras cerradas cuidadosamente durante 1 h a 50 °C en la estufa calefactora o en el bloque calefactor.

Enfriar hasta temperatura ambiente, a continuación adición de 600  $\mu$ l de la solución de base y breve agitación.

20 A este respecto la medición de la absorción debe tener lugar en el plazo de 10 minutos.

Retirar todo el sobrenadante del estampado de colágeno con la pipeta de 1000  $\mu$ l y transferir a una cubeta de plástico de 1,5 ml.

25 Medición de la absorción a 570 nm en el plazo de 10 min tras la adición de la solución de base.

Programa de medición: Methods/Concentration/ENBP  
Punto de calibración: valor de medición estándar 50 (= 25 nmol de epóxido)  
Rayo paralelo y blanco: cubeta de plástico vacía

### 30 6. Evaluación

Por medio de las rectas de calibración (relación de concentración/absorción) se determina la cantidad de epóxidos reactivos. El resultado de la medición se representa en relación a la pesada del material de matriz examinado y resulta en:

35 Contenido de epóxido: ng/mg de colágeno

#### Resultados de ensayo:

40 A modo de ejemplo la Figura 8 muestra la actividad residual de epóxido de los materiales de colágeno producidos de acuerdo con la invención por medio de una matriz de acuerdo con el ejemplo de producción 1a así como su disminución exponencial en el transcurso del tiempo después de la liofilización (curva de descomposición). Las matrices examinadas en este caso se secaron a una temperatura de liofilización de como máximo 60 °C. A partir de la Figura se deduce además en particular la influencia de la rehumectación sobre la disminución de la actividad residual de epóxido. Para el examen se suministraron los materiales de colágeno directamente después de la liofilización en condiciones climáticas controladas de la rehumectación. Se comparó la disminución de la actividad residual de materiales con una duración de rehumectación de

- 50 a) 24 h,
- b) 48 h,
- c) 72 h y
- d) 96 h.

55 A este respecto la determinación se llevó a cabo en cada caso inmediatamente después de finalizar la rehumectación. Únicamente la muestra a) se almacenó antes de la realización de la primera medición durante 24 horas en condiciones normales del entorno. A partir de esto resultan los puntos de medición representados después de 48 h (2 días) para las muestras a) y b), 72 h (3 días) para las muestras a), b) y c), después de 96 h (4 días) para las muestras a), b), c) y d), así como después de 168 h (7 días) y después de 336 h (14 días) en cada caso para todas las muestras a) a d).

60 A este respecto se muestra claramente, que la actividad residual de epóxido con rehumectación creciente se descompone claramente más rápido y puede reducirse hasta una medida ya no detectable.

**Ejemplo 10:****Ensayo de citotoxicidad *in vitro***5 **(Ensayo XTT)****en material de colágeno reticulado con epoxi de acuerdo con el ejemplo de producción 3****1. MATERIAL Y MÉTODO**

10

**1.1 Material de ensayo:**

Material de colágeno reticulado con epoxi liofilizado de acuerdo con el ejemplo de producción 3

15 **1.2. PRODUCCIÓN DE LOS EXTRACTOS**

A partir del material de ensayo se cortaron a partir de 3 ensayos de colágeno diferentes en cada caso fragmentos de tamaño idéntico (9,6 cm<sup>2</sup>). Los fragmentos cortados se extrajeron durante 24 horas en 9,6 ml de medio de cultivo celular (medio RPMI 1640), complementado con FCS al 10 % (Gibco, Invitrogen, N° de ref. 10270-106), piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 4 mM y penicilina 100 mg/ml/estreptomina (medio completo) a 37,5 °C con agitación. Se extrajeron controles positivos y negativos de la misma manera.

Los materiales de ensayo se extrajeron de acuerdo con la norma ISO 10993-12 a una relación de superficie/volumen de 3 cm<sup>2</sup>/ml.

25

**1.3. CONTROL**

Mayores cantidades de los extractos de los controles negativos y positivos se produjeron por adelantado y se almacenaron a -20 °C. El 100 % de los extractos se descongelaron inmediatamente antes del tratamiento y se diluyeron. Los controles negativos y positivos se extrajeron en el medio completo de acuerdo con la norma ISO 10993-12 con una relación de superficie/volumen de 6 cm<sup>2</sup>/ml.

30

**1.3.1 CONTROL NEGATIVO**

35 RM-C (polietileno de alta densidad)

Fabricante: Hatano Research Institut, Hatano/Japón  
Lote: C – 042

**1.3.2 CONTROL POSITIVO**

Nombre: Latex  
proveedor: VWR International GmbH (64295 Darmstadt, Alemania)  
Lote: 03200694110385

45

**1.4 SISTEMA DE ENSAYO****1.4.1 CRITERIOS PARA LA ELECCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR L929**

La línea celular de la ATCC, CCL 1 NCTC clon 929 (clon de la cepa L, tejido conjuntivo de ratón) se utilizó con éxito a lo largo de varios años en experimentos *in vitro*. En particular la alta tasa de proliferación (tiempo de duplicación: 16 horas, medido el 22 de octubre de 1992) y la buena viabilidad de las células no tratadas (por regla general más del 70 %), ambas necesarias para una realización del estudio adecuada, hablan de la elección de esta línea celular.

**1.4.2 CULTIVOS CELULARES**

Grandes cantidades de la línea celular L929 (suministrada por LMP, Universidad Técnica de Darmstadt, D-64287 Darmstadt) se almacenaron en nitrógeno líquido en el banco de células Harlan Cytotest Cell Research GmbH, lo que permite el uso repetido de la misma carga de cultivo celular en los experimentos. De esta manera, debido a las características reproducibles de las células se garantiza que se mantengan los parámetros constantes en los experimentos.

60

Los cultivos de células madre descongeladas se multiplican a 37 ± 1,5 °C en frascos de plástico (Greiner, D-72634 Frickenhausen), la colonización se llevó a cabo con aproximadamente 2x10<sup>5</sup> células/frasco de cultivo en 6 ml de medio completo. Las células se subcultivaron dos veces a la semana. Los cultivos celulares se incubaron a 37 ± 1,5 °C y 5,0 ± 0,5 % de atmósfera de dióxido de carbono.

65

**1.5 GRUPOS DE ENSAYO**

- 5 1.5.1 Control de medio: medio completo
- 1.5.2. Control negativo: RM-C  
extraído con medio completo durante 24 horas; 100 % de extracto
- 1.5.3. Control positivo: látex  
extraído con medio completo durante 24 horas; 3 % de extracto, 10 % de extracto, 30 % de extracto, 70 % de extracto, 100 % de extracto
- 10 1.5.4. Material de prueba: matriz de colágeno de acuerdo con el ejemplo de producción 3  
extraída con medio completo durante 24 horas; 3 % de extracto, 10 % de extracto, 30 % de extracto, 100 % de extracto

**1.6 REALIZACIÓN DE ENSAYO**

**1.6.1. CULTIVO CELULAR**

15 Cultivos madre que crecen exponencialmente, con más de un 50 % de confluencia, se lavaron con solución salina libre de Ca-Mg y se trataron con tripsina a  $37 \pm 1,5$  °C durante 5 min (Gibco BRL solución de tripsina/EDTA 10x N° de cat. 35400-019). Entonces se detuvo la separación enzimática mediante la adición del medio completo y se preparó una única suspensión celular.

20 La solución salina libre de Ca-Mg mostró la siguiente composición (por l):

25	NaCl	800 mg
	KCl	400 mg
	Glucosa	1000 mg
	NaHCO <sub>3</sub>	350 mg

30 Pocillos individuales de una placa de microtitulación de cultivo celular de 96 cavidades (Greiner) se mezclaron con 0,1 ml de medio que contenía aproximadamente 15.000 células. El medio era medio completo.

Las placas se incubaron durante 24 horas, para permitir la adhesión celular.

**1.6.2 TRATAMIENTO**

35 Después se retiró el medio y se mezclaron las células con medio de tratamiento 0,1 molar, que contenía distintas concentraciones de los extractos de los materiales de prueba, de los extractos de control negativo y de los extractos de control positivo así como del control de medio.

40 Todas las incubaciones se llevaron a cabo a  $37 \pm 1,5$  °C en una atmósfera húmeda con atmósfera de CO<sub>2</sub>  $5,0 \pm 0,5$  %.

**1.6.3 MARCAJE CON XTT Y MEDICIÓN**

45 Después del tiempo de incubación de 24 horas se agregaron 50  $\mu$ l de la mezcla de marcaje con XTT. La mezcla contiene el reactivo de marcaje con XTT y un reactivo de acoplamiento electrónico (relación de volumen 1:100). Las células se incubaron durante aproximadamente 1 hora y 35 minutos y a continuación se transfirieron al lector de microplacas (Versamax® Molecular Devices, D-85737 Ismaning) equipado con un filtro de 450 nm para la medición de la absorción (longitud de onda de referencia 690 nm).

**1.7 REGISTRO DE DATOS**

55 Los datos generados se registraron como datos sin procesar. Los resultados se representan en forma tabulada que contiene los grupos de prueba con los materiales de prueba, medio negativo y grupo control.

**1.8 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS**

60 Una disminución del número de células vivas da como resultado una disminución de la actividad total de la deshidrogenasa mitocondrial en las muestras. Esta disminución está directamente correlacionada con la cantidad de formazán naranja formado, medido a través de la absorción. Los resultados para la respuesta de citotoxicidad dependiente de la dosis pueden representarse como media aritmética  $\pm$  desviación estándar. Para calcular la concentración del material tóxico, que es necesaria para reducir la absorción en comparación con el control de medio en un 50 % (XTT<sub>50</sub>), se usó la siguiente fórmula:

$$XTT_{50} = \text{Conc. } > 50 - \frac{(\text{Conc. } > 50 - \text{Conc. } < 50) \cdot (\% > 50 - 50)}{(\% > 50 - \% < 50)}$$

- 5 a) Conc. > 50 = concentración medida máx. con % del control de medio >50 %  
 b) Conc. <50 = concentración medida mín. con % del control de medio <50 %  
 c) %>50 = absorción relativa en a) en %  
 d) %<50 = absorción relativa en b) en %

Cuanto menor es el valor de XTT<sub>50</sub>, mayor es el potencial citotóxico del material de prueba.

- 10 Una reducción de la viabilidad hasta <70 % y ≥50 % del control de medio significa una baja citotoxicidad. En el caso de una reducción de la viabilidad hasta <50 % del control de medio existe potencial citotóxico.

**2. RESULTADOS**

15 **2.1. TABLA DE LOS RESULTADOS**

Resultados después de 24 horas de extracción en medio completo

Grupo de prueba	Concentración de extracto [ %]	Absorción*	Desviación estándar	Valor vacío químico	Absorción en % del control de medio **
Control de medio		1,388	0,155	0,101	100,00
Material de prueba	3	1,246	0,141	0,101	88,97
Material de prueba	10	1,283	0,057	0,102	91,76
Material de prueba	30	1,258	0,046	0,103	89,74
Material de prueba	100	1,320	0,028	0,100	94,79
Control negativo	100	1,192	0,107	0,105	98,37
Control de medio		1,206	0,079	0,101	100,00
Control positivo	3	1,273	0,144	0,105	105,70
Control positivo	10	0,903	0,040	0,106	72,13
Control positivo	30	0,130	0,002	0,109	1,90
Control positivo	70	0,129	0,002	0,111	1,72
Control positivo	100	0,134	0,001	0,114	1,81

\* absorción media (absoluta) de 7 pocillos  
 \*\* absorción relativa [valores redondeadas]:

$$\frac{100 X (\text{absorbancia}_{\text{muestra}} - \text{absorbancia}_{\text{blan cos quím.}})}{(\text{absorbancia}_{\text{control de disolvente}} - \text{absorbancia}_{\text{blan cos quím.}})}$$

Valores de XTT<sub>50</sub> de los materiales de prueba: no pudieron calcularse, ya que la viabilidad de las células no se redujo de manera relevante.

Valores de XTT<sub>50</sub> del control positivo: 16,3 % (v/v)

- 20 Las absorciones indicadas muestran valores redondeados. Las absorciones relativas se calcularon recurriendo a los valores de absorción correctos.

Los grupos de ensayo sombreados representan la concentración de material de prueba en los que ensayos microscópicos después del tratamiento muestran cambios morfológicos de las células debido a la citotoxicidad

separada.

### 3. DISCUSIÓN

5 Este ensayo *in vitro* se llevó a cabo para someter a ensayo el potencial citotóxico de material de colágeno reticulado con epoxi liofilizado de acuerdo con el ejemplo de producción 3 por medio de prueba de XTT con el uso de la línea celular de ratón L929

10 De tres materiales de prueba se cortan en cada caso fragmentos idénticos (9,6 cm<sup>2</sup>), los fragmentos cortados se extraen tal como se describió anteriormente.

Se examinaron las siguientes concentraciones de extractos de prueba:

15 3 %, 10 %, 30 % y 100 % (v/v)

se sometieron a ensayo las siguientes concentraciones de extractos (control positivo):

3 %, 10 %, 30 %, 70 % y 100 % (v/v).

20 Entre el control de medio (medio completo) y el control negativo (control negativo extraído RM-C) no pudieron observarse diferencias relevantes.

25 El control positivo (látex) mostró una clara reducción dependiente de la dosis de la viabilidad celular y proliferación celular. Con el extracto patrón de referencia sin diluir (100 %) se mostró una reducción de la viabilidad celular y/o proliferación celular en los pocillos respectivos de alrededor de un 1,81 %. El valor de XTT<sub>50</sub> calculado es del 16,3 % (v/v).

30 En ninguno de los extractos examinados del material de colágeno de acuerdo con el ejemplo de producción 3 pudieron observarse efectos citotóxicos después de la incubación. El valor de XTT<sub>50</sub> no pudo calcularse, dado que la viabilidad de las células no se redujo de manera relevante.

### 4. RESULTADO

35 En resumen puede establecerse que en el contexto de este ensayo en las condiciones experimentales representadas, extractos del material de prueba de acuerdo con el ejemplo de producción 3 no pudo mostrarse ningún potencial citotóxico hasta la concentración de prueba más alta.

#### Ejemplo 11:

40 **Medición de la rigidez / módulo E de elasticidad**

(según Stok et al.; J Biomed Mater Res; 2009)

45 **en material de colágeno reticulado con epoxi de acuerdo con el ejemplo de producción 2a y 2b**

**(5 % y 10 % de agente de reticulación de epóxido/masa seca)**

50 La rigidez se midió de acuerdo con Stok *et al.* 2009 mediante pruebas de compresión con una máquina de ensayo de material (Zwick/Roell 1456, Ulm) con un captador de fuerza de 5 N. Un tamaño adecuado para la matriz de ensayo se determinó según Spilker et al.; Journal of Biomechanical Engineering, Jg. 114, H, 2, pág. 191-201; 1992; el diámetro ascendió a 1,38 mm. La muestra se encontraba en un soporte sobre una mesa de microcoordinadas (véase la figura), en la que se recubrió con PBS. Una cubierta de plexiglas impidió la curvatura hacia arriba de la muestra.

55 La matriz se desplazó de forma escalonada un 5 %, un 15 % y un 25 % del grosor de muestra en profundidad en la muestra y se sujetó, hasta que el sistema se había relajado. El módulo E se determinó a partir del valor medio de los diez últimos valores de la fase de equilibrio de tres etapas de impresión:

60 El módulo E [kPa] es la pendiente del alargamiento (x) y tensión (y)  
 Alargamiento = profundidad de impresión [mm]/grosor de la muestra [mm]  
 Tensión = fuerza [mN] / superficie de la matriz [mm<sup>2</sup>]

65 La muestra se impregnó durante al menos 15 minutos en PBS, se colocó en el soporte y en el mismo se recubrió con PBS, se dejó reposar durante al menos 5 minutos. Como superficie de la muestra se definió el ajuste en el que el sensor detectó una resistencia de 0,1 mN. La determinación de los valores E tuvo lugar mediante medición por triplicado (n=3).

La disposición de ensayo está representada a modo de ejemplo en la Figura 9.

Resultado:

5 Matrices de colágeno de acuerdo con el ejemplo de producción 2a (5 % de epóxido) muestran una rigidez de 9 kPa.

10 Matrices de colágeno de acuerdo con el ejemplo de producción 2b (10 % de epóxido) muestran una rigidez de 22 kPa.

15 Una matriz de colágeno-elastina no reticulada (reticulada de manera deshidrotérmica) mostró una rigidez de únicamente 6 kPa.

**Ejemplo 12:**

15 **Uso de las matrices de colágeno reticuladas**

Los materiales de acuerdo con la invención de acuerdo con los ejemplos de producción 1 a 3 son especialmente adecuados para el uso como agente cosmético y farmacéutico.

20 **Ejemplo de aplicación 12<sup>a</sup>**

**Uso como máscara cosmética**

25 Los materiales de acuerdo con la invención de acuerdo con los ejemplos de producción 1 a 3 se cortan para el tratamiento en la forma y el tamaño deseados de las zonas de piel que van a tratarse y, o bien

30 a) se coloca en seco sobre la piel que va a tratarse y se humedece mediante rociado con agua o una solución de activador hasta la saturación o

30 b) antes de colocarse sobre la piel se humedece con agua o una solución de activador hasta la saturación y a continuación se coloca en estado rehidratado sobre las zonas de la piel que van a tratarse.

35 Las capas de colágeno rehidratadas se dejaron durante un periodo de tiempo de aproximadamente 20 a 30 min sobre los sitios de piel tratados.

40 Durante este tratamiento se mostró una clara atenuación de rojeces o irritaciones existentes, así como de picazón presente, un aspecto más fresco, una mayor elasticidad de la piel así como una hidratación de la piel mejorada.

40 **Ejemplo de aplicación 12b**

**Uso como implante subcutáneo**

45 Los materiales de acuerdo con la invención de acuerdo con los ejemplos de producción 1 y 2 pueden utilizarse como implante subcutáneo en el campo de la cirugía plástica o reconstructiva con el fin del aumento de volumen reconstructivo, por ejemplo en el caso de pérdida de volumen de piel en la zona del centro del rostro debido a las más diversas etiologías, intervenciones rinoplásticas o también en operaciones reconstructivas estéticas, tal como por ejemplo es necesario después de operaciones de tumores o traumatismos en todo el cuerpo.

50 Antes del implante puede cortarse el material en el estado seco para la zona de piel subyacente y adaptarse de manera correspondiente.

55 Antes de la introducción de la matriz en el bolsillo de piel preparado previamente, ésta debe rehidratarse en solución de cloruro de sodio o Ringer fisiológica ampliamente estéril. La colocación de la matriz en el bolsillo de piel subdérmico preparado tiene lugar sin dificultad directamente después de la rehidratación final de la matriz en solución de cloruro de sodio o Ringer fisiológica estéril. El cierre de herida se adaptará de manera correspondiente al procedimiento quirúrgico y se decidirá por el médico encargado.

Efecto de la matriz:

60 Durante el implante, la matriz actúa como estructura de soporte y permite el asentamiento de células que participan en el aumento de volumen de la piel. Las células que han migrado construyen en el contexto del proceso de curación estructuras de tejido endógenas y proporcionan así el aumento de volumen deseado en la zona del implante incorporado. Con el avance de la neogénesis tisular puede reabsorberse y remodelarse la estructura de la matriz por completo.

65

La estructura de colágeno estructurada de manera nativa es opcionalmente óptima para soportar la encarnación de células y vasos y por lo tanto la neogénesis tisular.

5 El uso de la matriz entre dos capas de tejido diferentes puede actuar además de manera preventiva contra la adhesión y contracturas secundarias.

### **Ejemplo de aplicación 12c**

#### **Uso como sustituto de la dermis (implante)**

10 **(heridas agudas y crónicas)**

15 Los materiales de acuerdo con la invención de acuerdo con los ejemplos de producción 1 y 2 pueden usarse en heridas de toda la piel y defectos dérmicos de forma profunda en la cirugía de calcinación, en la cirugía reconstructiva plástica y en el tratamiento de heridas de mala curación sensibles al trasplante (por ejemplo heridas crónicas) para la construcción dérmica en combinación con trasplantes de piel dividida autólogos.

Aplicación:

20 El fragmento correspondiente de material se sacó de forma estéril del envase y se cortó de acuerdo al tamaño del defecto de la piel.

25 Ahora se coloca el material seco sobre la herida y se comprimió en primer lugar en la zona de la herida por medio de un paño abdominal.

El material empieza a humedecerse con secreción de herida y se adhiere de forma segura libre de burbujas a la base de la herida. Los bordes se cortan hasta un solapamiento estrecho de aproximadamente 2 mm en forma circular.

30 Si el material se encuentra correctamente en la zona de la herida, entonces se instila por medio de una jeringa con cuidado solución de cloruro de sodio; como alternativa puede comprimirse un paño abdominal muy húmedo, impregnado con solución de cloruro de sodio y se deja durante algunos minutos. Después de este tiempo el material está completamente rehidratado y se encuentra de manera correspondiente a la colocación exactamente en el lecho de herida.

35 El trasplante de la piel dividida en la zona de la herida tiene lugar directamente sobre el material. Una sujeción adicional del material junto con la piel dividida se consigue mediante cosido o grapas. Si la matriz se cubre sólo después del retardo temporal mediante el trasplante de piel dividida, deberá garantizarse que no se reseque. Para ello es adecuada por ejemplo una gasa estéril, no adherente impregnada con solución de cloruro de sodio fisiológica.

45 Para cubrir la herida se recomienda una lámina de silicona no oclusiva o varias capas de gasa de grasa libre de principio activo, para garantizar un medio de herida húmedo. En la práctica hasta el momento ha resultado ser conveniente usar un vendaje apretado de una combinación de 5-6 capas de gasa grasa y 3-4 capas de vendaje de gasa. La técnica de vendaje ha de configurarse para garantizar un contacto adecuado entre la piel dividida y la base de la herida e interceptar fuerzas de cizalladura. La colocación de un vendaje de subpresión sobre heridas tratadas depende de la decisión médica en el caso individual. En muchos casos se obtuvieron buenos resultados con esta técnica de vendaje.

50 El objetivo del tratamiento es la construcción de una neodermis, para mejorar la calidad de la piel regenerada, reducir la cicatrización e impedir la contracción de la herida.

### **Ejemplo de aplicación 12d**

55 **Uso como agente para la hemostasia (agente hemostático)**

**(heridas agudas y quirúrgicas)**

60 Los materiales de acuerdo con la invención de acuerdo con los ejemplos de producción 1 y 2 pueden utilizarse como agente hemostático de aplicación local, preferentemente en operaciones con hemorragias venosas y de supuración difusa por ejemplo en la cirugía de vísceras, cirugía de vasos cardio-torácicos, neurocirugía, cirugía maxilar y estomatología general, HNO, urología y ginecología.

65 El material se coloca preferentemente en seco sobre la herida limpia y se amolda ligeramente, pero también puede humedecerse antes de la aplicación. En el caso de hemorragias más intensas, puede tamponarse con una compresa húmeda. Mayores superficies de herida se tratan con varios fragmentos, para superficies pequeñas puede

cortarse con la tijera de manera correspondiente.

Modo de acción:

- 5 El material absorbe el múltiplo de su propio peso de líquido. Los trombocitos se agregan a la gran superficie interna y contribuyen mediante factores de coagulación liberados a la hemostasia local. La fibrina generada ancla la matriz de colágeno con la base de la herida y forma así un cierre de herida estable.

Mediante este tratamiento puede conseguirse una hemostasia rápida.

10

### **Ejemplo de aplicación 12e**

**Uso como apósito para heridas dérmico / transdérmico para heridas con exudación**

15 **(heridas crónicas)**

Los materiales de acuerdo con la invención de acuerdo con los ejemplos de producción 1 y 2 pueden utilizarse como apósito para heridas para el tratamiento de heridas interactivo local.

- 20 Para el efecto óptimo, el material debería aplicarse directamente sobre todo el lecho de herida. En heridas con poca o ninguna exudación, el material puede humedecerse con solución de cloruro de sodio o Ringer. El apósito para heridas debe cubrirse con un vendaje secundario adecuado, para mantener un medio de cicatrización húmedo. Después de la primera aplicación se tratará la herida en función de la intensidad del exudado en espacios de hasta 72 horas de nuevo con el material. Matriz aún no reabsorbida puede permanecer a este respecto en la herida.

25

Modo de acción:

El material puede absorber el múltiplo de su propio peso de líquido y es por lo tanto adecuado del mejor modo para la gestión del líquido de la herida. Con la absorción de la secreción de herida se absorben también necrosis, capas de bacterias y de fibrina desprendidas por la herida, mediante lo cual se promueve y puede acelerarse la formación del tejido de granulación. Ambos efectos conllevan una aceleración de la cicatrización.

30

### **Ejemplo de aplicación 12f**

35 **Uso en la terapia de tratamiento de heridas soportada por vacío (heridas crónicas)**

Para la aplicación se aplican los materiales de acuerdo con la invención de acuerdo con los ejemplos de producción 1 y 2 sobre las partes del cuerpo que van a tratarse o sobre la herida en seco, cortándose el material, en caso necesario, en la forma de la herida. El material se humedece y se rehidrata entonces o bien mediante secreción de herida presente o bien con agua o una solución acuosa o solución de cloruro de sodio fisiológica. Es además posible humedecer los materiales de acuerdo con la invención antes de la aplicación sobre las partes del cuerpo que van a tratarse.

40

A continuación se cierra la herida de manera estanca al aire con una lámina de cubrición resistente al vacío convencional. A través de dispositivos convencionales para evacuar el líquido de la herida (unidad de drenaje) se aspira después de la aplicación de una subpresión adecuada (vacío), el líquido de la herida de acuerdo con procedimientos de terapia de vacío convencionales.

45

Mediante este tratamiento puede conseguirse una disminución de la superficie de herida, una reunión de los bordes de la herida, una intensificación de la formación de tejido de granulación y a través de ello conseguirse una aceleración de la cicatrización.

50

Explicaciones de las Figuras:

- 55 La Figura 1: método de BCA: determinación de los constituyentes proteicos solubles [%] en una matriz de colágeno reticulada con epoxi con proteínas de matriz solubles adicionales (hidrolizado de elastina) de acuerdo con el ejemplo de producción 2 en comparación con una matriz de colágeno reticulada exclusivamente de manera deshidrotérmica con hidrolizado de elastina ("no reticulada).

- 60 La Figura 2a: prueba de digestión con colagenasa: determinación de la tasa de degradación [%] de matrices de colágeno reticuladas con epoxi de acuerdo con la invención de acuerdo con ejemplos de producción 1a y 2a en comparación con una matriz de colágeno reticulada exclusivamente de manera deshidrotérmica con hidrolizado de elastina ("no reticulada); en el plazo de 6 horas.

- 65 La Figura 2b: prueba de digestión con colagenasa: determinación de la cantidad absoluta del porcentaje disuelto de las matrices de colágeno reticuladas con epoxi de acuerdo con la invención (normalizado con respecto a 10

mg) de acuerdo con los ejemplos de producción 1a y 2a en comparación con una matriz de colágeno reticulada exclusivamente de manera deshidrotérmica con hidrolizado de elastina ("no reticulada"); en el plazo de 23 horas.

5 La Figura 3: estabilidad frente a la hidrólisis: a) matriz de colágeno reticulada de manera deshidrotérmica ("no reticulada") con triglicéridos/aceite neutro (temperatura de liofilización >120 °C), b) matriz de colágeno reticulada con epoxi de acuerdo con la invención de acuerdo con el ejemplos de producción 3 (5 % de epóxido/TM; con triglicéridos/aceite neutro; temperatura de liofilización <100 °C); c) matriz de colágeno reticulada con epoxi de manera correspondiente a la composición según el ejemplo de producción 3 (5 % de epóxido/TM; con triglicéridos/aceite neutro; temperatura de liofilización > 120 °C).

10 La Figura 4: grado de hidrólisis después de 18 días a) de una matriz de colágeno reticulada de manera deshidrotérmica en comparación con b) una matriz de colágeno de acuerdo con la invención según el ejemplo de producción 3.

15 La Figura 5: influencia de la temperatura de liofilización sobre la resistencia a la rotura por tracción en húmedo (método interno UV8801).

20 La Figura 6: influencia de la temperatura de liofilización y de la concentración de reticulante de epóxido sobre la resistencia a la rotura por tracción en húmedo (método interno UV8801).

La Figura 7: influencia del tiempo de permanencia y de la temperatura durante el tiempo de permanencia de la suspensión/mezcla acuosa de colágeno antes de la congelación sobre la resistencia a la rotura por tracción en húmedo (método interno UV8801).

25 La Figura 8: actividad residual de epóxido e influencia de la rehumectación sobre la disminución de la actividad residual de epóxido de una matriz de colágeno de acuerdo con la invención según el ejemplo de producción 1.

La Figura 9: estructura de ensayo para la medición de la rigidez/módulo de elasticidad E

30

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la producción de matrices de colágeno reticuladas que comprende las etapas:
- 5 a) preparar una suspensión de colágeno acuosa,  
b) ajustar el valor de pH de la suspensión de colágeno de la etapa a) a  $\text{pH} < 4$ ,  
c) dado el caso agregar otros formadores de estructura, principios activos y/o sustancias auxiliares,  
d) agregar un agente de reticulación epoxifuncional siendo variable el orden de las etapas c) y d),  
e) congelar la mezcla de colágeno que puede obtenerse de la etapa d),  
10 f) liofilizar la mezcla congelada de la etapa e) a una temperatura de liofilización  $< 100\text{ }^{\circ}\text{C}$   
g) ajustar opcionalmente el material de colágeno reticulado liofilizado que puede obtenerse de este modo a un contenido de humedad de hasta el 25 % en peso, con respecto al producto final y  
h) dado el caso transferir los materiales que pueden obtenerse de la etapa g) al molde deseado, esterilizar y/o confeccionar.
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la suspensión de colágeno de la etapa a) comprende colágeno insoluble en ácido nativo en forma de fibras y fibrillas.
- 20 3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la suspensión de colágeno comprende constituyentes peptídicos y de colágeno solubles en ácido y/o en el que en la etapa c) se agregan formadores de estructura o principios activos del grupo de las proteínas de matriz, constituyentes de matriz extracelulares, principios activos proteinógenos y constituyentes peptídicos o proteicos solubles.
- 25 4. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 o 3, en el que el agente de reticulación epoxifuncional se selecciona de diepóxidos tal como en particular 1,4-butanodioldiglicidil éter (BDDGE).
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente de reticulación epoxifuncional se agrega en una cantidad de como máximo el 50 % en peso, con respecto a la masa seca de la suspensión de colágeno de la etapa a).
- 35 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la congelación de acuerdo con la etapa e) se lleva a cabo en el plazo de 24 horas después de la preparación de la mezcla de colágeno de la etapa d).
7. Matriz de colágeno reticulada que puede obtenerse de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6.

H64496EP  
Dr. Suwelack Skin & Health Care AG

## Ejemplo de preparación 2 - Elastina

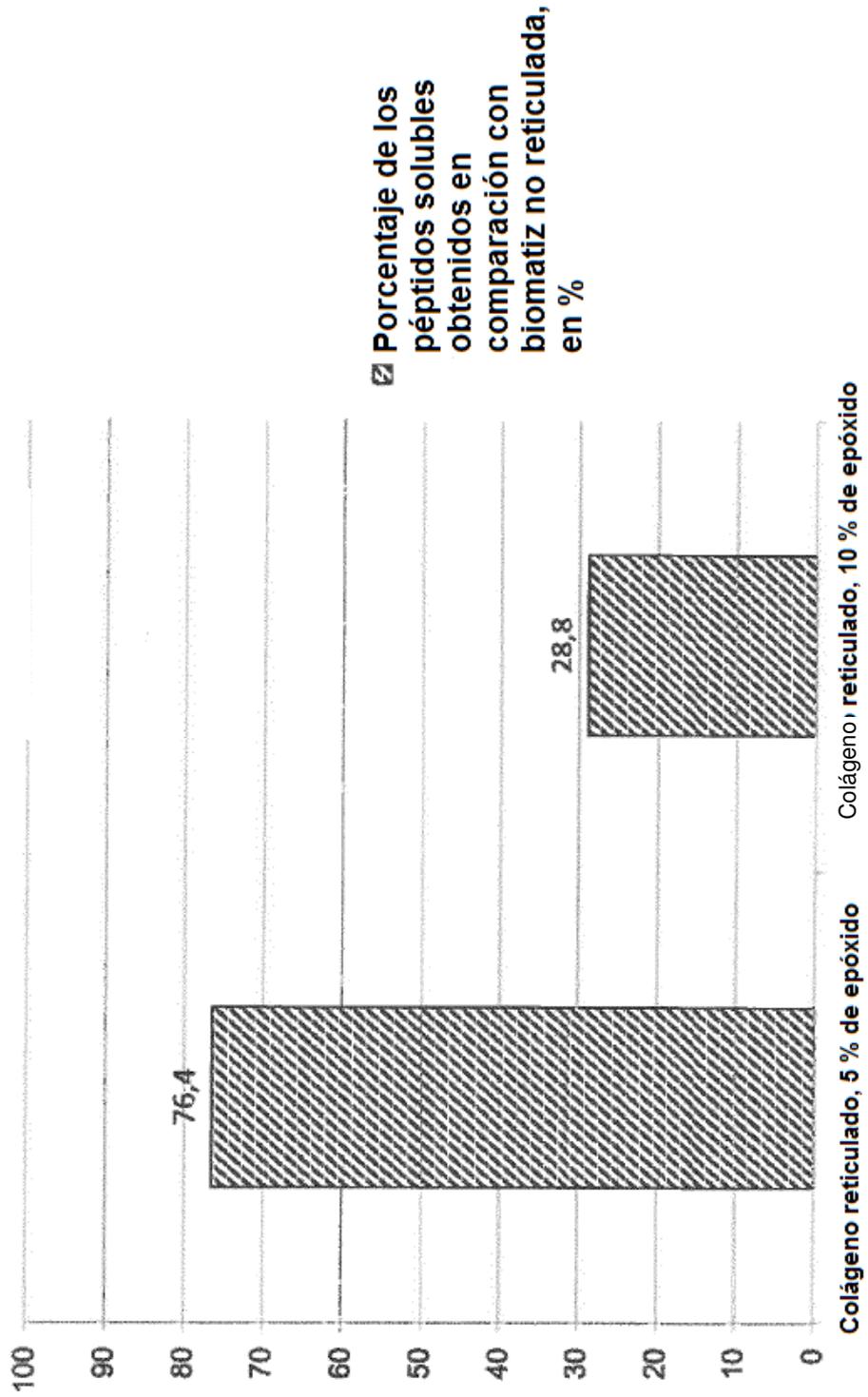


Figura 1

H64496EP  
Dr. Suwelack Skin & Health Care AG

### Ensayo de colagenasa: tasa de degradación secado < 100 °C

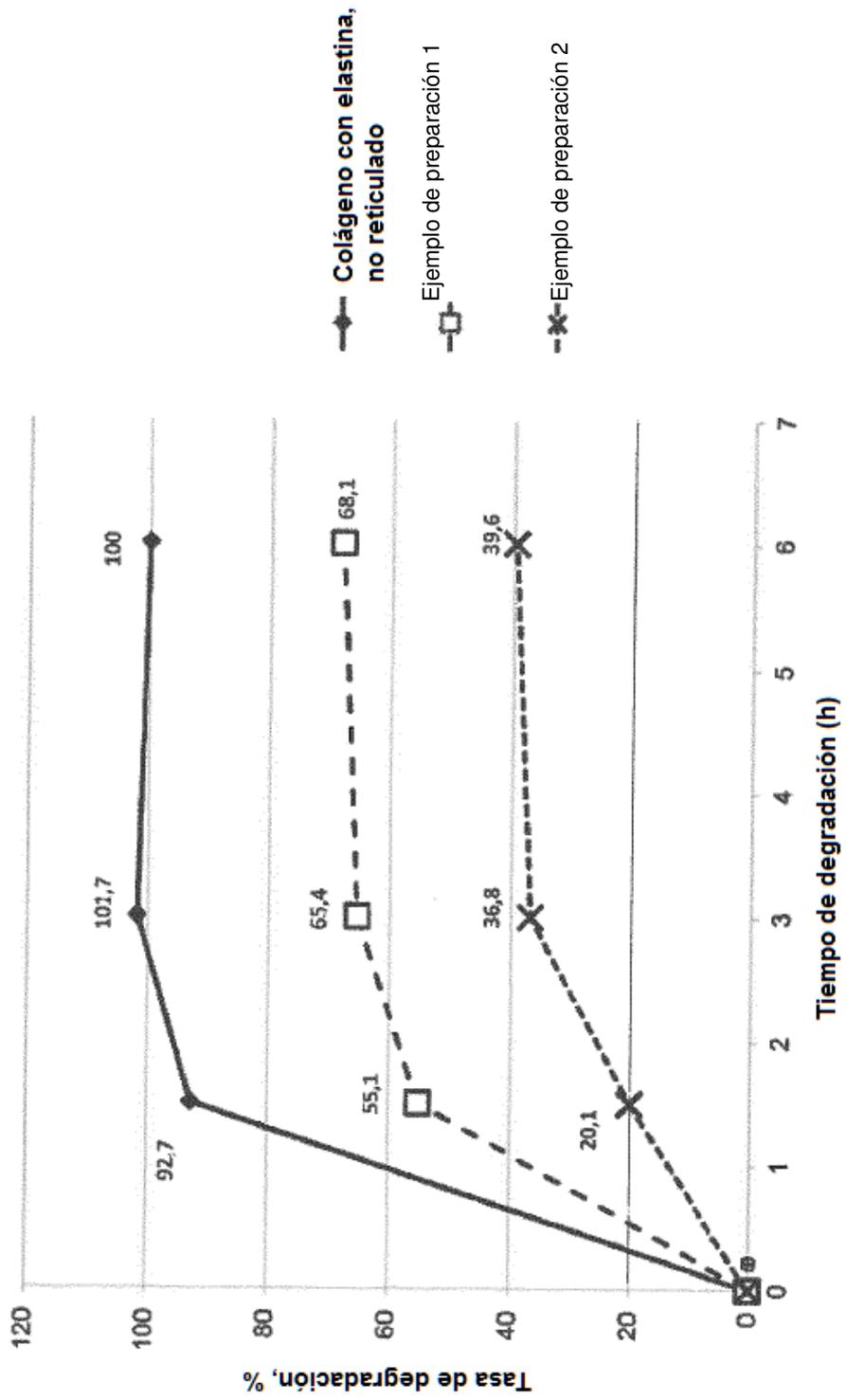


Figura 2a

H64496EP  
 Dr. Suwelack Skin & Health Care AG

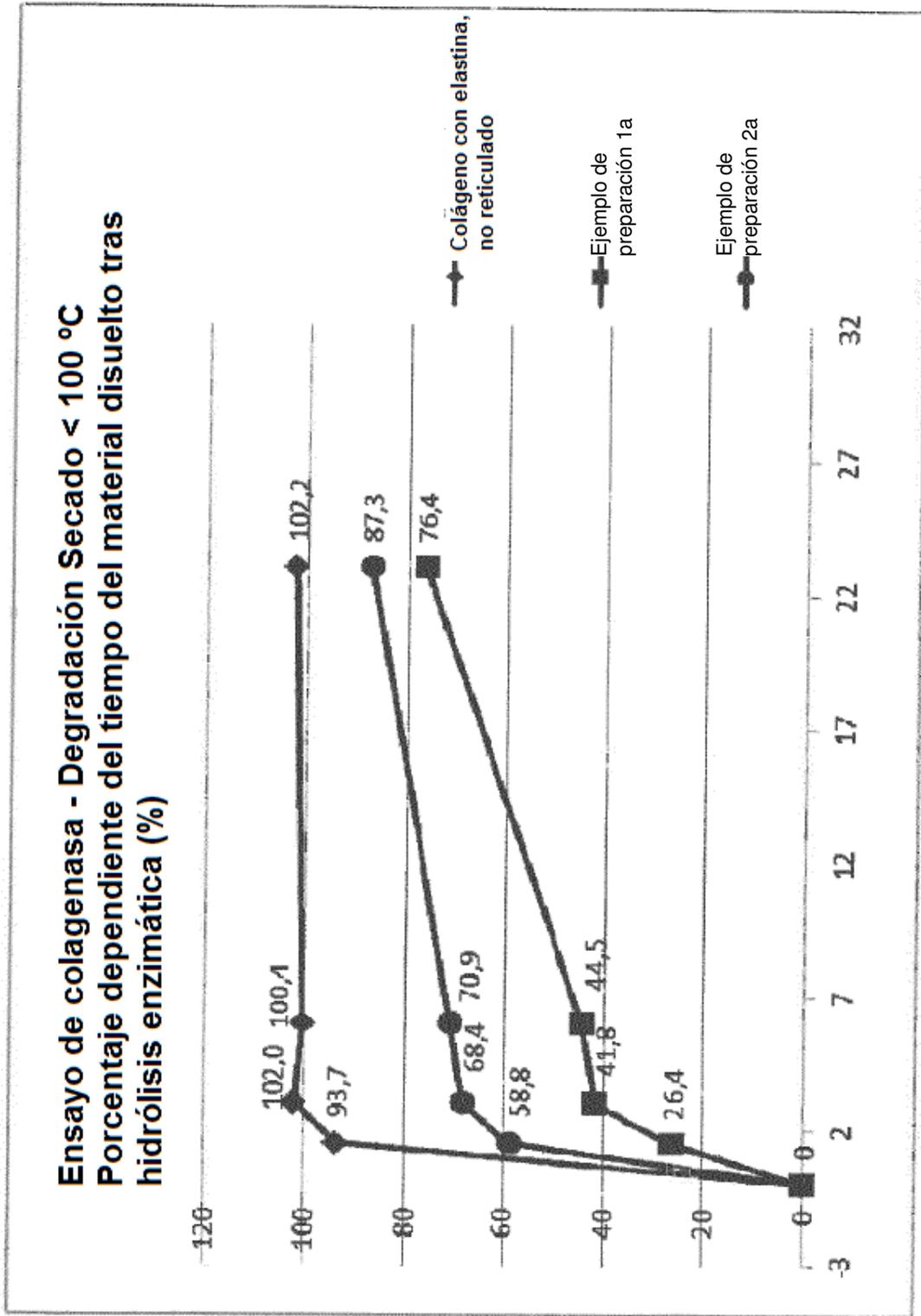


Figura 2b

H64496EP  
Dr. Suwelack Skin & Health Care AG

**Empaquetado húmedo Ejemplo de preparación 3**  
**Tamaño restante después de almacenamiento a 50 °C**

■ No reticulado, Secado > 120 °C    ▨ Ejemplo 3, Secado < 100 °C

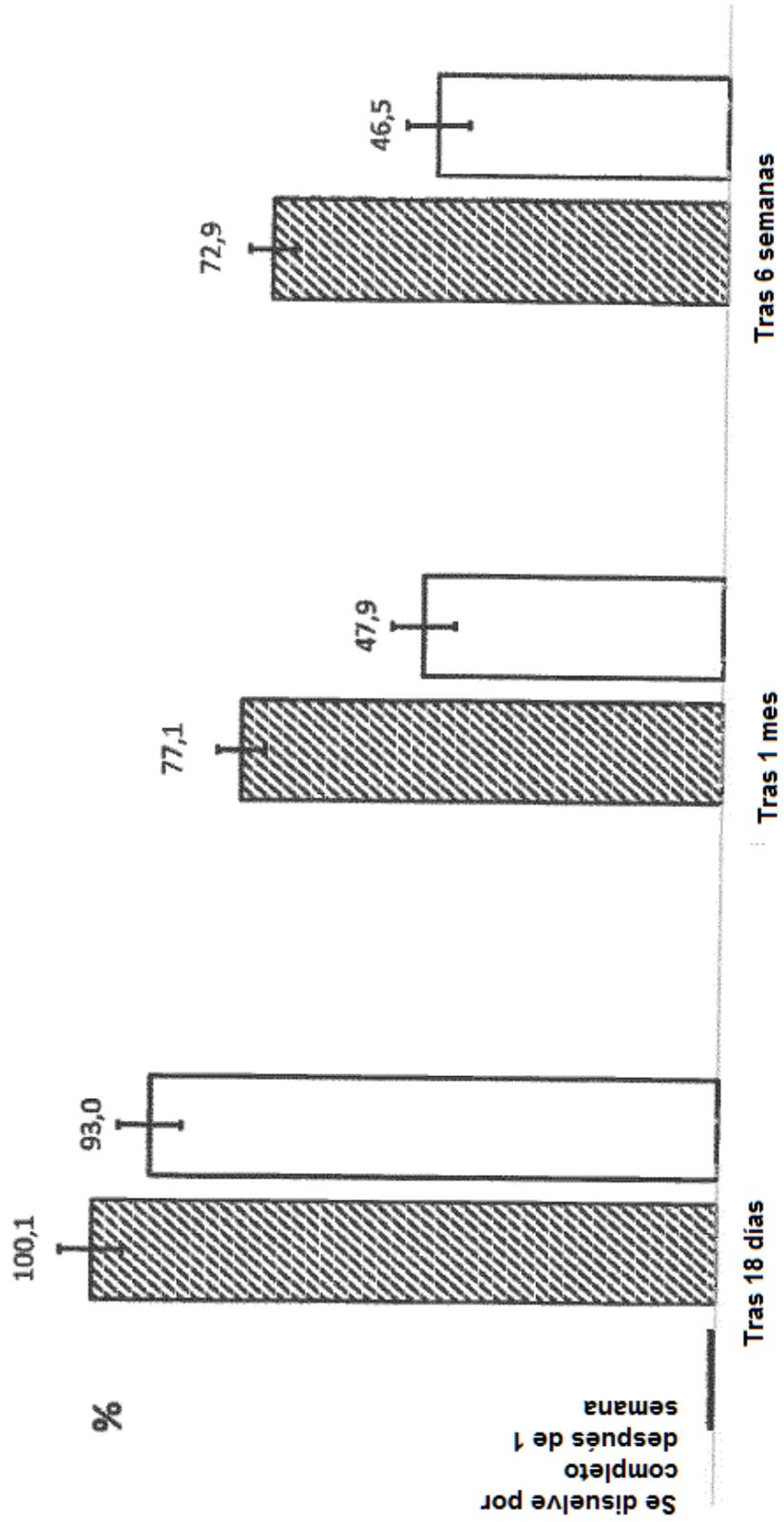


Figura 3

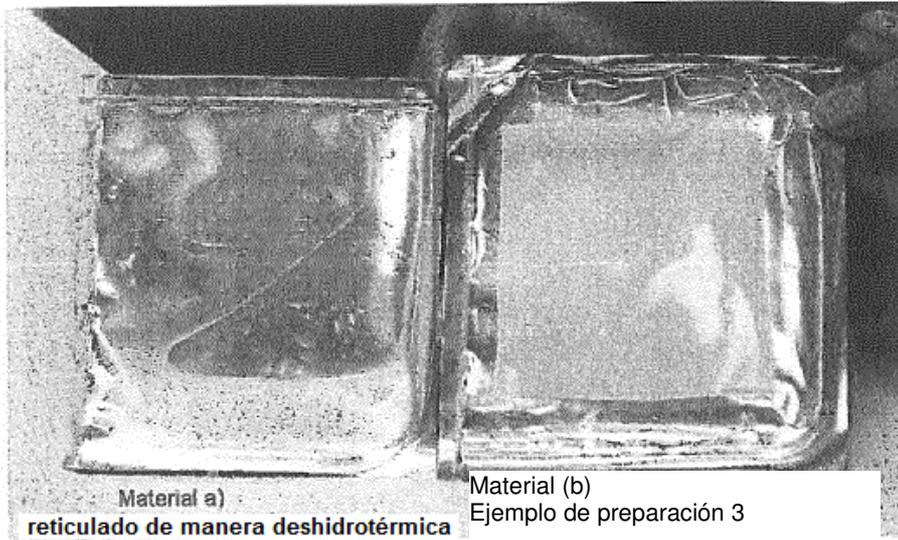


Figura 4

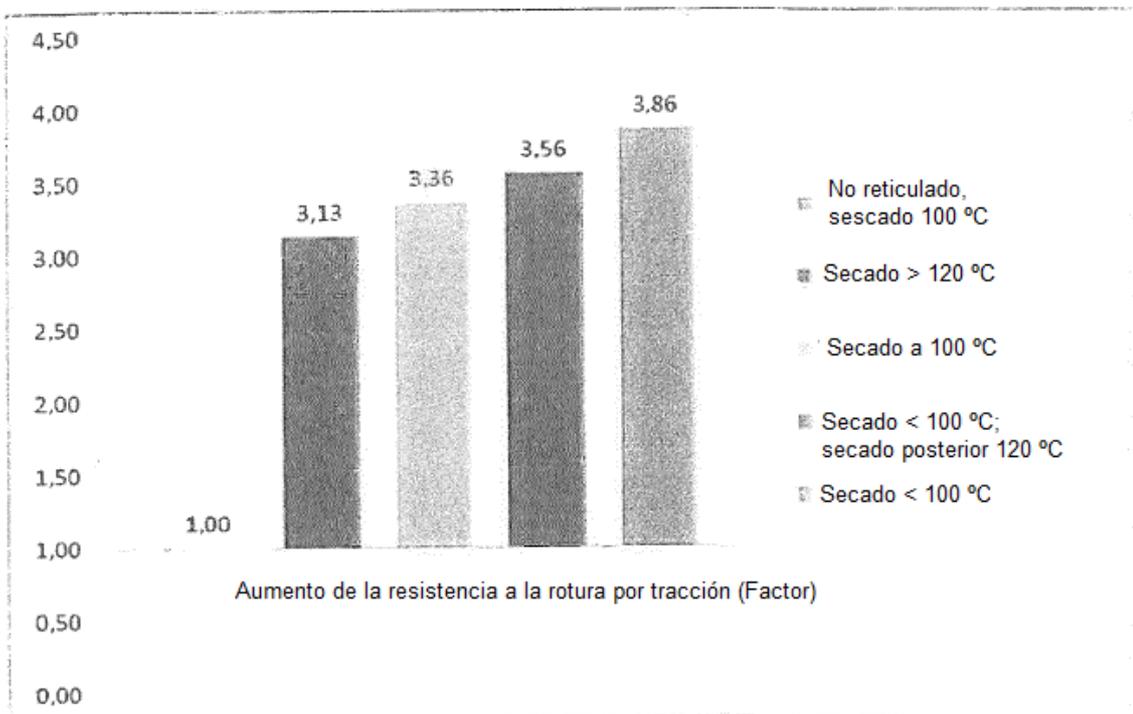


Figura 5

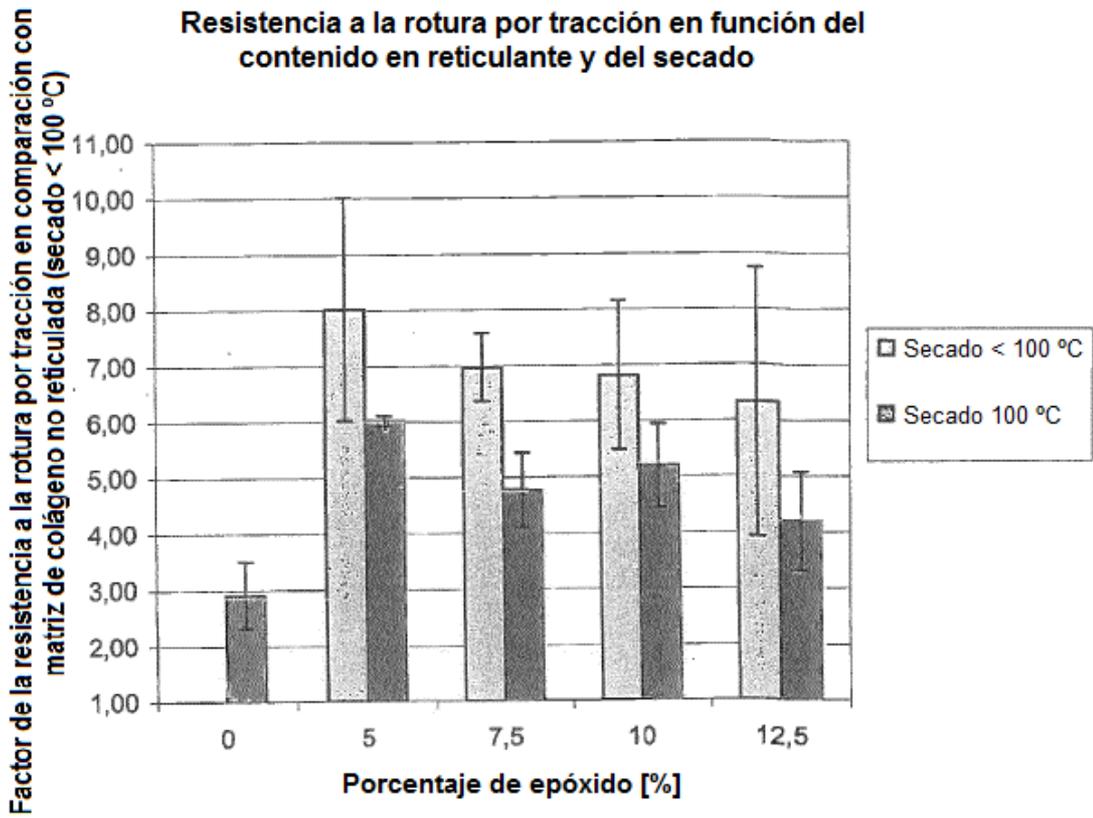


Figura 6

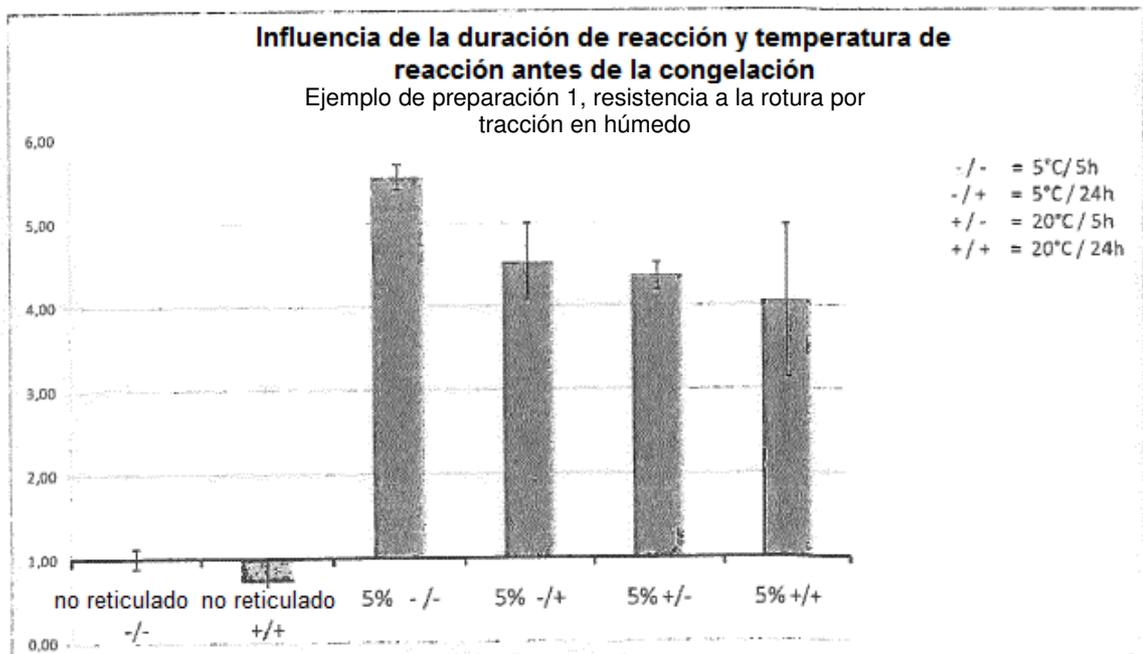


Figura 7

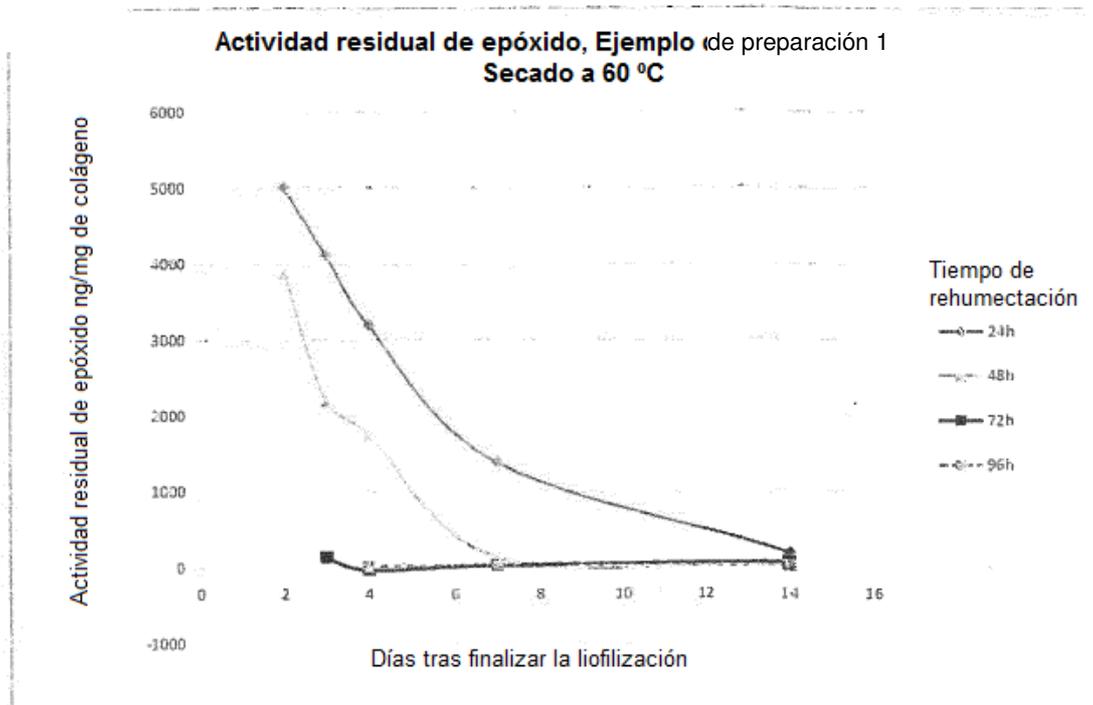


Figura 8

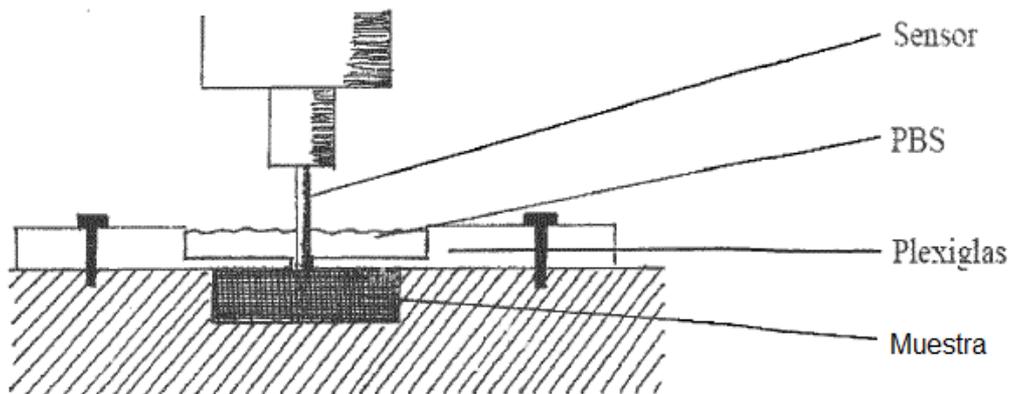


Figura 9