

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 059**

51 Int. Cl.:

A61L 27/04 (2006.01)

A61L 27/44 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2011 E 11730136 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2575908**

54 Título: **Material polimérico conjugado y sus usos**

30 Prioridad:

07.06.2010 US 397100 P

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

31.03.2016

73 Titular/es:

**THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF
MISSOURI (100.0%)
316 University Hall
Columbia, MO 65211, US**

72 Inventor/es:

**HARRIS, ANTHONY;
THOMPSON, JONATHAN;
RONE, REBECCA;
GRANT, SHEILA y
GRANT, DAVID**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 565 059 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

Material polimérico conjugado y sus usos

Antecedentes de la invención**A. Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a colágeno unido a partículas mediante enlace covalente, que produce un material que es más resistente a la degradación, tal como a la degradación por colagenasa. El presente material puede utilizarse en una amplia serie de aplicaciones.

B. Descripción de la técnica relacionada

- 10 El uso de colágeno en el tratamiento de la incontinencia urinaria, de la insuficiencia cardíaca congestiva después de un ataque al corazón, de las fracturas articulares y de los defectos cutáneos faciales congénitos y relacionados con la edad, se limita por la estabilidad y la integridad de los materiales de colágeno disponibles actualmente. Por ejemplo, los materiales de relleno dérmicos en base a colágeno que se utilizan para tratar el envejecimiento facial (por ejemplo, mejora del contorno facial, mejora de las arrugas, corrección de una cicatriz deprimida, etc.) y para aumentar los labios son muy susceptibles a la degradación durante un periodo de 12 meses.

- 15 Una solución propuesta al problema de la degradación de colágeno es la reticulación del colágeno mediante la formación de enlaces covalentes entre la macromolécula de las fibrillas de colágeno. Sin embargo, la toxicidad de los productos químicos utilizados para reticular el colágeno puede suscitar inquietud. Por ejemplo, el glutaraldehído y el diisocianato de hexametileno se incorporan en el armazón de colágeno durante la reticulación y pueden liberar residuos tóxicos en el cuerpo cuando se degrada el colágeno. Otro problema es que el exceso de reticulación puede
20 crear un material de colágeno rígido e inutilizable.

El documento WO 2010/033860 A1 desvela un tejido descelularizado que comprende una mezcla de materiales que comprende, entre otros, colágeno no soluble, en el que el tejido descelularizado se reticula con un nanomaterial previamente seleccionado.

Sumario de la invención

- 25 La invención se dirige a una composición inyectable o implantable según la reivindicación 1. La invención también se refiere a un procedimiento para reducir la degradación de colágeno *in vitro* mediante la degradación enzimática según la reivindicación 15. Los inventores han descubierto una solución a los problemas de rendimiento que limitan los productos actuales en base a colágeno. La presente solución incluye el uso de partículas que presentan un
30 diámetro medio de partículas de 60 a 900 nanómetros capaces de formar enlaces covalentes con colágeno. El material conjugado (por ejemplo, composiciones que comprenden el material, colágeno/partículas conjugados, o fibrilla/partículas de colágeno conjugados) es más resistente a la degradación (por ejemplo, por colagenasa), biocompatible, y se produce en una matriz o armazón de colágeno que presenta un nivel aceptable de porosidad, permitiendo así el crecimiento celular. El crecimiento celular se acelera por las partículas conjugadas en el material innovador. En ciertos casos, el material conjugado presenta asimismo propiedades antimicrobianas, que pueden
35 utilizarse para combatir la infección tras su posterior administración a un paciente.

- En ciertos casos, el colágeno también puede reticularse mediante un agente de reticulación, tal como una carbodiimida (por ejemplo, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) y/o por las partículas en sí (por ejemplo, el colágeno puede reticularse con las partículas, en el que al menos una de las partículas incluye al menos dos grupos reactivos, y en el que al menos pueden formarse dos enlaces covalentes entre, por ejemplo, los grupos ácido
40 carboxílico del colágeno y al menos dos grupos reactivos, en el que los dos grupos reactivos pueden formarse entre, por ejemplo, los grupos amina.). En ciertos aspectos, el colágeno reticulado es poroso y puede presentar un tamaño de poro medio que oscila de 500 nanómetros a 200 micrómetros (y cualquier número entero o intervalo en el mismo, tal como 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900 nanómetros). En aspectos particulares, puede utilizarse un intervalo de tamaño de poro entre 1 micrómetro y 100
45 micrómetros (o cualquier número entero o intervalo en el mismo, tal como 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90 micrómetros). En ciertos casos, las partículas presentan un diámetro medio de partículas de 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 nanómetros. En realizaciones particulares, el diámetro medio de partículas oscila de 70 a 800, 80 a 700, 90 a
50 600, 100 a 500, 150 a 400, o 200 a 300 nanómetros. En ciertos aspectos, el diámetro medio de partículas oscila de 60 a 140, 70 a 130, 80 a 120, o 90 a 110 nanómetros. Las partículas pueden estar formadas por o comprenden material metálico. El material metálico puede ser oro, plata, platino, titanio, níquel, o cobre o cualquier combinación de los mismos. En aspectos particulares, el material metálico es oro o plata. Las partículas también pueden fabricarse de o comprenden material cerámico o material biodegradable. En ciertas realizaciones, la relación de
55 partículas en colágeno puede ser un intervalo de 1×10^9 partículas por mg de colágeno a 2×10^{10} partículas por mg de colágeno, no obstante, se contemplan intervalos más amplios (por ejemplo, 1×10^4 a 1×10^{14} por mg de colágeno, y cualquier intervalo y número entero en el mismo). En algunos aspectos, pueden utilizarse 2 a 4 mg de un agente de reticulación de carbodiimida (por ejemplo, EDC) por 30 mg de colágeno para formar los enlaces

- covalentes (en aspectos particulares, la relación que puede utilizarse puede ser 3,2 mg +/- 0,8 de un agente de reticulación de carbodiimida, tal como EDC por 30 mg de colágeno). Asimismo, pueden utilizarse 0,5 a 0,2 mg de un agente de reticulación de carbodiimida (por ejemplo, EDC) por 1×10^9 - 2×10^{10} partículas para formar los enlaces covalentes. En ciertos aspectos, el material de la presente invención puede incluir, además, células que pueden utilizarse para ayudar en las opciones de tratamiento. Los ejemplos no limitantes de dichas células incluyen: células madre embrionarias, células madre adultas, células madre pluripotentes inducidas, y células derivadas de las mismas, células de origen endodérmico, mesodérmico o ectodérmico incluyendo, entre otras, células epiteliales, células exocrinas y endocrinas, mioblastos, fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, células estromales, hepatocitos, células de los islotes, neuroblastos, queratinocitos, osteoclastos, osteocitos, células cardíacas, condrocitos, células endoteliales, y/o células musculares, y sus combinaciones. El colágeno que puede utilizarse incluye los tipos de colágeno I, II, III, IV o V, o su combinación. En realizaciones particulares, el material puede encontrarse en forma de gel, una solución, una pasta, nano o micrómetro de colágeno electrohilado, láminas de colágeno, o una estructura rígida deshidratada. El material puede contenerse en una jeringa o en una solución inyectable. El material puede ser una composición dermatológicamente aceptable o un equivalente dérmico o epidérmico. En ciertos aspectos, la cantidad de grupos ácido carboxílico libres o grupos amina libres presentes en el material conjugado de colágeno/partícula es al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, o 90 % inferior en comparación con el colágeno que no se ha conjugado con una partícula. En otras palabras, se conjugan al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, o 90 % o más de los grupos ácido carboxílico libres o amina libres del colágeno.
- 20 También se contempla una fibrilla de colágeno unida por enlace covalente a al menos a una partícula, en la que al menos una partícula presenta un diámetro medio de partículas que oscila de 20 a 1.000 nanómetros o 50 a 1.000 nanómetros. En aspectos particulares, el enlace covalente puede formarse entre un grupo ácido carboxílico libre y/o amina en la fibrilla de colágeno y un grupo reactivo presente en la superficie de la partícula. El grupo reactivo puede ser, por ejemplo, un grupo amina reactivo, un grupo carboxilato reactivo, un grupo tiol reactivo, y/o un grupo hidroxilo reactivo. En un aspecto, el enlace covalente puede formarse entre los grupos ácido carboxílico libres presentes en la fibrilla de colágeno y los grupos amina reactivos en las partículas, en el que los enlaces amida pueden formarse entre los grupos ácido carboxílico de la fibrilla de colágeno y los grupos amina reactivos de las partículas.
- Se desvela un procedimiento para rellenar huecos, defectos, o incrementar el volumen tisular en un mamífero, que comprende administrar a un paciente, o a un mamífero que lo necesite (por ejemplo, ser humano, caballo, vaca, cerdo, perro, gato, conejo, rata, ratón, etc.), cualquiera de los materiales desvelados en la presente memoria descriptiva. Los materiales, colágeno/partículas conjugados, o fibrilla/partículas de colágeno conjugado pueden administrarse por una inyección intradérmica o subcutánea. El hueso puede ser una línea o arruga fina y la aparición de la línea o arruga fina puede reducirse tras la administración. Los materiales, colágeno/partículas conjugados, o fibrilla/partículas de colágeno conjugado pueden administrarse en un labio del mamífero, en los que el volumen tisular del labio aumenta tras la administración.
- Se desvela un procedimiento para aumentar el tejido blando o el tejido duro en un mamífero en necesidad del mismo que comprende administrar o aplicar uno cualquiera de los materiales desvelados en la presente memoria descriptiva en el tejido blando o duro. El tejido blando puede ser un músculo cardíaco, un músculo liso, un músculo esquelético, tejido de los meniscos, un cartílago, tendones, ligamentos, fascia, piel, vasos sanguíneos, un tejido fibroso, o una matriz extracelular. Por ejemplo, los materiales pueden utilizarse para soportar el músculo del miocardio en un paciente que es susceptible o que ya ha sufrido un ataque al corazón. Con respecto al tejido duro, ejemplos no limitantes incluyen huesos o dientes. Los materiales pueden utilizarse para tratar fracturas óseas o pueden utilizarse para potenciar el crecimiento óseo aplicando los materiales a las fracturas óseas o a los huesos en los que se desea un aumento del crecimiento óseo.
- Se desvela un procedimiento para incrementar el cartílago articular aumentando el volumen tisular en una persona, que comprende administrar a una persona en necesidad del mismo uno cualquiera de los materiales o composiciones descritos a lo largo de la memoria descriptiva en una cápsula articular.
- En un aspecto, se desvela un procedimiento para reducir la degradación del colágeno *in vitro* mediante la degradación enzimática que comprende conjugar colágeno con partículas que presentan un diámetro medio de partículas que oscila de 60 a 900 nanómetros, en el que los enlaces covalentes se forman entre el colágeno y las partículas, y en el que la degradación del colágeno por la colagenasa se reduce de este modo en comparación con el colágeno que no se conjuga con las partículas. La conjugación se produce a través de un enlace covalente entre los grupos ácido carboxílico libres de colágeno y los grupos reactivos presentes en la superficie de las partículas. Los grupos reactivos son grupos amina reactivos. Dicho colágeno se inyecta o implanta.
- Se desvela un procedimiento para aumentar la unión celular *in vitro* o *in vivo* que comprende conjugar colágeno con partículas que presentan un diámetro medio de partículas que oscila de 20 a 1.000 nanómetros o 50 a 1.000 nanómetros, en el que los enlaces covalentes se forman entre el colágeno y las partículas, y en el que el área superficial con respecto a la relación en volumen de las nanopartículas atrae la repoblación celular y la síntesis de colágeno. La conjugación puede realizarse a través de un enlace covalente entre los grupos ácido carboxílico libres o grupos amina libres de colágeno y los grupos reactivos presentes en la superficie de las partículas. Los grupos reactivos pueden ser, por ejemplo, grupos amina reactivos, grupos carboxilato reactivos, grupos tiol reactivos, y/o

grupos hidroxilo reactivos. En un aspecto, el enlace covalente puede formarse entre los grupos de ácido carboxílico libres presentes en el colágeno y los grupos amina reactivos en las partículas, en el que los enlaces amida pueden formarse entre los grupos ácido carboxílico del colágeno y los grupos amina reactivos de las partículas. El procedimiento puede incluir además la administración de colágeno conjugado a un mamífero (por ejemplo, inyección intradérmica o subcutánea o aplicación tópica).

Se desvela un procedimiento para generar tejido que comprende la siembra de uno cualquiera de los materiales desvelados en la presente memoria descriptiva con células madre embrionarias, células madre adultas, células madre pluripotentes inducidas, y células derivadas de las mismas o la siembra con células de origen endodérmico, mesodérmico o ectodérmico incluyendo, entre otras, células epiteliales, células exocrinas y endocrinas, mioblastos, fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, células estromales, hepatocitos, células de los islotes, neuroblastos, queratinocitos, osteoclastos, osteocitos, células cardíacas, condrocitos, células endoteliales, y/o células musculares. El procedimiento puede incluir además la administración de colágeno conjugado a un mamífero.

Los materiales desvelados a lo largo de la memoria descriptiva pueden utilizarse asimismo para tratar enfermedades urinarias (por ejemplo, incontinencia urinaria) administrando a un mamífero en necesidad del mismo dicho material. A modo de ejemplo, los materiales pueden formarse en un Arnés pélvico o pueden utilizarse con un Arnés pélvico existente. Alternativamente, los materiales pueden encontrarse en forma inyectable y pueden utilizarse como agentes espesantes para reducir o prevenir la incontinencia urinaria inyectando dicho material en el mamífero.

Asimismo se desvela un procedimiento para coagular la sangre que comprende administrar a un mamífero en necesidad del mismo los materiales desvelados a lo largo de la memoria descriptiva en un sitio en el que se desea la coagulación de la sangre (por ejemplo, heridas internas o externas). Ejemplos no limitantes de heridas externas incluyen úlceras por presión, cortes, arañazos, incisiones, heridas abiertas, pérdida de extremidades, etc.

Se desvela un procedimiento para tratar la osteoartritis que comprende administrar a un mamífero en necesidad del mismo uno cualquiera de los materiales desvelados a lo largo de la memoria descriptiva. Por ejemplo, los materiales pueden administrarse en una cápsula o cartilago articular como agente espesante para favorecer el recrecimiento y disminuir el dolor.

Se desvela un procedimiento para potenciar el crecimiento nervioso que comprende administrar a un mamífero en necesidad del mismo uno cualquiera de los materiales desvelados a lo largo de la memoria descriptiva. Por ejemplo, los materiales pueden administrarse a los nervios como conductos para el crecimiento o recrecimiento nervioso.

También se desvela un procedimiento para fabricar material conjugado de colágeno/partículas de la presente invención. Dicho procedimiento incluye 1) funcionalizar las partículas previamente seleccionadas y 2) reticular las partículas funcionalizadas con las fibras de colágeno solubles en presencia de un reactivo bioconjugado. El procedimiento puede incluir además un periodo de incubación para la polimerización tras la etapa de reticulación. En un aspecto, el procedimiento incluye: (1) obtener partículas funcionalizadas (por ejemplo, partículas metálicas, tales como oro funcionalizadas con cisteamina); (2) añadir las partículas funcionalizadas a una solución que comprende EDC y NHS y de manera opcional tampón; y (3) añadir colágeno a la solución con mezcla. En ciertas realizaciones, la relación de partículas en colágeno puede ser un intervalo de 1×10^9 partículas por mg de colágeno a 2×10^{10} partículas por mg de colágeno, no obstante, se contemplan intervalos más amplios (por ejemplo, 1×10^4 a 1×10^{14} por mg de colágeno, y cualquier intervalo y número entero en el mismo). Asimismo, pueden utilizarse 2 a 4 mg de un agente de reticulación de carbodiimida (por ejemplo, EDC) por 30 mg de colágeno para formar los enlaces covalentes (en aspectos particulares, la relación que puede utilizarse puede ser 3,2 mg +/- 0,8 de un agente de reticulación de carbodiimida, tal como EDC por 30 mg de colágeno), y/o pueden utilizarse 0,5 a 0,2 mg de un agente de reticulación de carbodiimida (por ejemplo, EDC) por 1×10^9 - 2×10^{10} partículas para formar los enlaces covalentes.

Se desvela un procedimiento para aumentar la celularidad, favorecer un influjo de células, favorecer la adhesión celular, o favorecer la migración celular en un implante de colágeno o un agente espesante en base a colágeno, que comprende el uso de cualquier material o composición desvelado a lo largo de la memoria descriptiva para fabricar una implante de colágeno o el agente espesante en base a colágeno. También se desvela un procedimiento para aumentar la celularidad, un influjo de células, favorecer la adhesión celular, o favorecer la migración celular en un implante de colágeno o un agente espesante en base a colágeno, que comprende unir colágeno, mediante enlace covalente, con las partículas para formar el implante de colágeno o el agente espesante en base a colágeno, en el que los enlaces amida covalentes se forman entre los grupos de ácido carboxílico libres del colágeno y los grupos amina reactivos de las partículas, y en el que las partículas presentan un tamaño de diámetro medio de partículas que oscila de 50 a 1.000 nanómetros. Tales procedimientos pueden incluir además la administración del implante de colágeno o agente espesante en base a colágeno a una persona en necesidad del mismo.

Se contempla que los materiales desvelados a lo largo de la memoria descriptiva pueden comprenderse dentro de un vehículo dermatológicamente aceptable, un vehículo farmacéuticamente aceptable, o un vehículo farmacológicamente aceptable. Tales vehículos son aquellos que no producen toxicidad prohibitiva, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica, y/o similares, cuando se administran a un mamífero, tal como un ser humano. Además, dichas composiciones pueden estar en forma de polvo, deshidratada, electrohilada, forma líquida, forma de

gel, semisólida, o sólida. A este respecto, las composiciones de la presente invención pueden presentar un intervalo de viscosidad entre 10 hasta 100.000.000 cps, medidas en un viscosímetro Brookfield que utiliza un husillo TC a 2,5 rpm a 25 °C. En aspectos particulares, puede utilizarse un intervalo de 150.000 a 250.000.

5 Las vías de administración de los materiales y composiciones de la presente invención pueden variar con la ubicación y naturaleza de la afección a tratar. A modo de ejemplo, aplicación tópica, intradérmica, parenteral, intramuscular, subcutánea, percutánea, intratraqueal, intraperitoneal, inyección directa (por ejemplo, una solución inyectable), y quirúrgica (por ejemplo, mediante la incisión y colocación en el área diana).

10 Se contempla que cualquier realización discutida en la presente memoria descriptiva puede implementarse en relación con cualquier procedimiento o composición de la invención, y viceversa. Además, las composiciones de la invención pueden utilizarse para lograr los procedimientos de la invención.

"Colágeno inyectable" incluye pastas, geles, soluciones, o suspensiones, homogéneos o heterogéneos de colágeno, que se contienen en jeringas, tubos u otros recipientes equipados con émbolos o sistemas apropiados, concebidos para extrudir el colágeno a través de una aguja o una boquilla. El colágeno inyectable se diseña para la inyección, aplicación quirúrgica mediante un trocar, o la aplicación directa en una superficie de la herida.

15 "Mamíferos" incluye seres humanos, caballos, vacas, cerdos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, etc.

"Tejido queratinoso" incluye capas que contienen queratina dispuestas como la cubierta protectora externa de mamíferos e incluye, entre otros, piel, cabello y uñas.

20 "Aplicación tópica" significa aplicar o extender una composición sobre la superficie del tejido queratinoso. "Composición tópica para la piel" incluye composiciones adecuadas para la aplicación tópica sobre el tejido queratinoso. Tales composiciones son normalmente dermatológicamente aceptables dado que cuando se aplican sobre la piel no presentan toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad indebida, y similares. Las composiciones tópicas para el cuidado de la piel de la presente invención pueden seleccionar su viscosidad para evitar el goteo o la agrupación significativa después de haberse aplicado sobre la piel.

25 El término "aproximadamente" o "aproximadamente" se define como la manera más próxima comprendida por un experto en la materia, y en una realización no limitante el término se define dentro del 10 %, preferentemente dentro del 5 %, más preferentemente dentro del 1 %, y más preferentemente dentro del 0,5 %.

El término "inhibir" o "reducir" o cualquier variante de este término, cuando se utiliza en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva incluye cualquier disminución medible o inhibición completa para lograr un resultado deseado.

30 El término "eficaz", según se utiliza este término en la memoria descriptiva y/o en las reivindicaciones, significa adecuar para lograr un resultado deseado, esperado, o previsto.

El uso del término "un" o "una" cuando se utiliza junto al término "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva, puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".

35 El término "que comprende" (y cualquier forma de comprender, tal como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, tal como "tienen" o "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir, tal como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, tal como "contiene" y "contienen") es inclusivo o abierto y no excluye elementos adicionales, no citados o etapas del procedimiento.

40 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, ha de entenderse, que la descripción detallada y los ejemplos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, solamente se dan a modo de ilustración.

Breve descripción de los dibujos

45 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención puede comprenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas a continuación.

50 **Figura 1.** Un diagrama esquemático para conjugar de forma covalente colágeno (designado "1") con una partícula de oro (designada "2") mediante la formación de un enlace amida entre un grupo de ácido carboxílico libre del colágeno y un grupo amina reactivo de la partícula funcionalizada con mercaptoetilamina (MEA). Se utilizan para facilitar la conjugación hidrocioruro de 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) y N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS).

Figura 2. Espectro UV que ilustra las partículas de oro funcionalizadas con β -mercaptoetilamina (MEA).

Figura 3. EEM de un armazón de gel conjugado con partículas de oro.

Figura 4. Imagen por EDE que demuestra que las partículas reticuladas son partículas de oro en la estructura del armazón.

Figura 5. Diagrama de barras que ilustra la resistencia mejorada a la degradación por colagenasa del colágeno conjugado con partículas de oro.

5 **Figura 6.** Diagrama de barras que ilustra la viabilidad celular en presencia de colágeno conjugado con partículas de oro.

Figura 7. Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier de colágeno con y sin partículas de oro que ilustra una disminución del 18 % en los grupos ácido carboxílico libres en el material conjugado de colágeno/partículas de oro en comparación con solo colágeno.

10 **Figura 8.** Concentraciones de ADN por grupo de armazón y tratamiento con el tiempo. El Día 7 se indica mediante la barra izquierda, y el Día 14 se indica mediante la barra derecha para cada grupo, respectivamente.

Figura 9. Concentraciones de glicosaminoglicanos (GAG) por grupo de armazón y tratamiento con el tiempo. El Día 7 se indica mediante la barra izquierda, y el Día 14 se indica mediante la barra derecha para cada grupo, respectivamente.

15 **Figura 10.** Tinción Live/Dead de todos los grupos en el Día 7 que demuestra una elevada viabilidad y celularización.

Figura 11. Celularización de los grupos en dos intervalos de tiempo que demuestra la proliferación superficial en el Día 7 con una penetración interna más compleja en el Día 14. Se observó la celularización de los canales y cavidades asociados a AuNP.

20 **Descripción de las realizaciones ilustrativas**

Los inventores han descubierto que mediante la unión covalente de las partículas a colágeno en grupos ácido carboxílico libres de colágeno o fibrillas de colágeno, puede reducirse la degradación de colágeno. Esto se traduce en un material a base de colágeno que es más estable cuando se administra a un mamífero para tratar o prevenir una enfermedad o afección cutánea particular. Además, mediante el uso de partículas que presentan un diámetro medio de partículas de 50 a 1.000 nanómetros, o incluso 50 a 150 nanómetros, el material de colágeno/partículas resultante crea un entorno que favorece la proliferación y la infiltración celular (por ejemplo, se atraen células que se encuentran presentes en el paciente o células que se incorporan en el material a las partículas, lo que permite una proliferación más sostenida y dinámica de las células de lo esperado, en comparación con el colágeno que no incluye dichas partículas) mientras que exhibe toxicidad reducida en comparación con las partículas que son inferiores a 20 nanómetros o inferiores a 50 nanómetros. Es decir, los inventores han descubierto una manera eficaz para estabilizar colágeno mediante la reducción de la degradación del colágeno al tiempo que favorece la proliferación celular sin riesgo de efectos secundarios tóxicos que se observan actualmente en los materiales en base a colágeno existentes.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los enlaces covalentes formados en los sitios carboxílicos libres de colágeno impidieron y/o bloquearon algunos de los sitios de unión de la colagenasa, mientras que el tamaño de partículas proporciona un área superficial suficiente y energía superficial que permite la adherencia celular, el aumento de la celularidad, y la adsorción de proteínas, favoreciendo así la proliferación y el crecimiento celular. Adicionalmente, las partículas metálicas pueden proporcionar efectos antioxidantes, lo que reduce las especies reactivas del oxígeno y otros radicales libres que pueden dañar las células, y las partículas metálicas pueden proporcionar efectos antimicrobianos. Además, el tamaño de partículas es suficiente para reducir la toxicidad en el entorno circundante mediante la prevención o la reducción de la captación celular de las partículas.

Estos y otros aspectos de la presente invención se describen a continuación con más detalle.

A. Colágeno

El colágeno es un tipo de proteína que se encuentra en los mamíferos que conecta y soporta los tejidos corporales, tales como piel, huesos, tendones, músculos y cartílagos. También proporciona soporte a los órganos internos y está presente en los dientes. Existen más de 25 tipos de colágeno que se presentan de forma natural en el cuerpo, todos ellos pueden utilizarse en el contexto de la presente invención. Los colágenos más frecuentes incluyen los Tipos I (hallado en la piel, tendones, vasculares, ligaduras, órganos, huesos), II (hallado en el cartilago), III (hallado en las fibras reticulares), IV (formas bases de la membrana basal celular) y V (hallado en las superficies celulares, pelo, y placenta). Algunas de las características estructurales más frecuentes de colágeno incluyen una gran cantidad de glicina, prolina, hidroxiprolina, grupos ácido carboxílico libres, y grupos amina libres, véase *Collagen Structure and Mechanics* (2008).

En cuanto a la piel, el colágeno aporta esta fuerza, flexibilidad y resistencia. También aporta una estructura para el crecimiento de las células y los vasos sanguíneos en la piel. La degradación del colágeno (por ejemplo, en la piel

envejecida, piel enferma, dañada, tal como cicatrices, daño solar, acné, etc.) da lugar a la presencia de líneas finas, arrugas, marcas, nódulos, surcos, y similares en la piel. Una forma de reducir la aparición de estos defectos en la piel es inyectar colágeno en la piel, que se traduce en el llenado de los defectos en la piel, por consiguiente, un "relleno dérmico." El colágeno también posee varios usos médicos que van desde el aumento de la movilidad articular, el tratamiento de quemaduras y otras heridas abiertas en la piel, hasta el tratamiento de la osteogénesis imperfecta (es decir, enfermedad de los huesos de cristal), y otros usos médicos desvelados y reivindicados a lo largo de la presente memoria descriptiva.

El colágeno que puede utilizarse en el contexto de la presente invención se puede extraer de un amplio intervalo de fuentes (por ejemplo, porcina, bovina, humana, de pescado, cola de rata, etc.). Materiales de colágeno no limitantes que pueden utilizarse incluyen colágeno recombinante humano, colágeno basado en tejidos humanos genéticamente modificados, colágeno porcino, colágeno placentario humano, colágeno bovino, colágeno autólogo, fibras de colágeno y matriz de colágeno de tejido humano. Además, el colágeno y los productos en base a colágeno, que también se pueden utilizar se disponen comercialmente, un ejemplo no limitante de los cuales se enumera en *International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook*, 12ª edición, volumen 1, página 656 (2008), que se incorpora por referencia. Ejemplos no limitantes adicionales de productos de colágeno comercialmente disponibles que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención incluyen CosmoDerm® 1 y 2, CosmoPlast®, Zyderm®, Zyplast® y Evolence®, todos ellos se fabrican por Inamed Corp., Santa Bárbara CA. En realizaciones particulares, se utiliza colágeno porcino.

B. Partículas y formación de unión covalente con colágeno

Como se ha explicado previamente, las partículas que presentan un tamaño de diámetro medio de partículas de 50 a 1.000 nanómetros, o 50 a 150 nanómetros pueden utilizarse en el contexto de la presente invención. El tamaño de diámetro medio de partículas puede determinarse por dispersión de luz dinámica (DLD). La DLD es una técnica que proporciona el perfil de distribución de tamaño de partículas en suspensión. El tamaño medio de partículas puede determinarse a partir del perfil de distribución de tamaño (Thomas (1987)). Además, existen varios recursos disponibles a través de los cuales se pueden adquirir u obtener partículas que presentan un tamaño de diámetro particular (por ejemplo, coloides de oro y plata NanoXact & BioPure PELCO® de Ted Pella, Inc. (Redding, CA); nanopartículas de oro esféricas Accurate, Nanorodz de oro, Microgold, nanoesferas de oro, nanohilos de oro, platino, paladio, y nanopartículas trimetálicas de NanoPartz, Inc. (Loveland, CO); y nanopartículas de oro, nanopartículas de plata, nanopartículas de platino, nanopartículas de paladio y nanopartículas verdes de Nanoparticle Biochem Inc, (Columbia, MO)).

Las partículas que se pueden utilizar pueden incluir o componerse de cualquier material metálico, material cerámico, y/o material biodegradable o su combinación. Con respecto a las partículas metálicas, los ejemplos no limitantes incluyen oro, plata, platino, titanio, níquel, y/o cobre. En casos particulares, el material utilizado para las partículas (por ejemplo, oro o plata) puede poseer propiedades antimicrobianas, que pueden resultar útiles para reducir la probabilidad de infección. Además, dicho material particulado puede funcionar como un aceptor de electrones y por lo tanto puede reducir el daño por radicales libres causado por especies reactivas del oxígeno ("ERO").

Las partículas utilizadas en el contexto de la presente invención pueden incluir grupos reactivos, cuyos ejemplos no limitantes incluyen grupos amina reactivos, grupos carboxilato reactivos, grupos tiol reactivos, grupos ácido carboxílico reactivos o grupos hidroxilo reactivos, o cualquier combinación de los mismos. Dichas partículas funcionalizadas se disponen comercialmente y pueden fabricarse por un experto en la materia. Además, puede emplearse la utilización de agentes de reticulación para favorecer la formación de enlaces covalentes entre el colágeno y las partículas y también puede utilizarse para favorecer la reticulación entre el propio colágeno (por ejemplo, la reticulación del colágeno puede ocurrir a través de las partículas cuando estas tienen al menos dos grupos funcionales presentes en los que uno de los grupos funcionales forma un enlace covalente con colágeno y el otro grupo funcional forma un segundo enlace covalente con colágeno o incluso en casos en los que el agente de reticulación forma enlaces covalentes entre el propio colágeno). Un procedimiento no limitante se proporciona a continuación.

En realizaciones particulares, las partículas incluyen grupos amina reactivos que son capaces de formar un enlace amida con grupos ácido carboxílico libres presentes en el colágeno. A modo de ejemplo, la FIG. 1 describe una realización de este tipo. En particular, la FIG. 1 ilustra que el grupo ácido carboxílico funcional en la fibra de colágeno 1, se activa en primer lugar por EDC, entonces la adición nucleófila genera un enlace amida entre la fibra de colágeno y el nanomaterial metálico 2. La EDC forma un grupo éster funcional activo con grupos carboxilato en las fibrillas de colágeno; pero la hidrólisis se produce rápidamente y por consiguiente la EDC se acopla generalmente a sulfo-NHS para formar un intermedio de éster de sulfo-NHS. Los intermedios de éster reaccionan a continuación con grupos amina en las nanopartículas metálicas. La EDC-sulfo-NHS facilita un enlace amida entre el colágeno y MEA unidos a la partícula con liberación de un subproducto de isourea. NHS se añade normalmente a EDC para potenciar la estabilidad y la unión.

Ha de considerarse la toxicidad de los productos químicos utilizados para favorecer la formación de enlaces covalentes entre el colágeno y las partículas y la reticulación de colágeno. El glutaraldehído, diisocianato de hexametileno, y EDC son agentes de reticulación utilizados comúnmente, pero solo la carbodiimida es no tóxica y no

se incorpora en el armazón de colágeno durante la reticulación (véanse, Shanmugam (2006), Lee (2001), Rault (1996), Grtzer (2001), Chan (2005), Billiar (2001), Pieper (1999), Haidekker (2006)). Por el contrario, el glutaraldehído y el diisocianato de hexametileno no se incorporan en el armazón y pueden liberar residuos tóxicos en el cuerpo cuando el armazón se degrada. Adicionalmente, la reticulación excesiva puede cambiar drásticamente la microestructura y provocar que el armazón sea tan resistente a la degradación que se encapsula mediante una capa fibrosa y nunca se reemplaza por el tejido sano.

C. Procedimiento para fabricar conjugados

El siguiente procedimiento es un modo no limitante para fabricar los materiales conjugados de la presente invención:

(1) Obtener colágeno no polimerizado:

- a. Mezclar 30 mg de colágeno liofilizado con 1 ml de ácido acético (10 mM).
- b. Disolver durante 3 horas a temperatura ambiente girando el vial gradualmente.

(2) Preparar nanomateriales concentrados funcionalizados:

- a. Girar 1.344 ml de 100 nm de una suspensión de nanopartículas de oro (concentración de AuNP $5,6 \times 10^9$ partículas/ml durante 5 min a 7.000 rpm).
- b. Eliminar 1.144 ml de agua dejando 0,2 ml de AuNP en una suspensión en agua.
- c. Añadir 9,1 μ l de cisteamina 0,12M (= beta-mercaptoetilamina; MEA) a 0,2 ml de una suspensión de AuNP.
- d. Mezclar para proporcionar nanomateriales funcionalizados mediante una pipeta, girándolos más de 3 veces, o mediante un vórtex durante 5 segundos a temperatura ambiente.

(3) Preparar 10 x una solución tampón fosfato salino (TFS).

(4) Disolver 0,0032 g de EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida y 0,00424 g de sulfon-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) en 0,2 ml 10 x tampón TFS.

(5) Añadir 0,209 ml de nanomateriales funcionalizados a 0,2 ml de EDC y NHS en 10 x tampón TFS si se utiliza colágeno de rata. En caso de utilizar colágeno humano entonces puede utilizarse el mismo sistema de tampón o uno diferente (por ejemplo, sistema de tampón fosfato dibásico de sodio).

(6) Añadir 0,045 ml de NaOH 1M a nanomateriales en tampón TFS.

(7) Mezclar 0,454 ml de nanomateriales funcionalizados de EDC, NHS en 10 x tampón TFS con NaOH a 1 ml de solución de colágeno a 30 g/l.

(8) Pipetear arriba y abajo 5-10 veces para garantizar la mezcla.

(9) Colocar en una incubadora a 37 °C durante 90 minutos para polimerizar.

(10) Eliminar el armazón recién formado de la incubadora y la condición para inyectarse en la aguja 30Ga o preparar el armazón en otras formas.

Como se ha señalado previamente, el presente procedimiento es un ejemplo no limitante de una forma de fabricar un conjugado de partículas/colágeno en el contexto de la presente invención. Se contemplan y pueden realizarse modificaciones y variaciones para preparar un producto final deseado de una opción de tratamiento particular.

D. Composiciones de la presente invención

Como se ha señalado previamente, los materiales conjugados de la presente invención (por ejemplo, colágeno/partículas conjugados, o fibrilla/partículas de colágeno conjugado) pueden incluirse en las composiciones, tales como composiciones inyectables, composiciones tópicas, composiciones implantables, y pueden adquirir diversas formas (por ejemplo, líquida, en polvo, deshidratada, semisólida, en gel, sólida, rígida, etc.). Las composiciones también pueden incluir ingredientes adicionales, tales como ingredientes cosméticos (activos y no activos) e ingredientes farmacéuticos (activos y no activos) en función de la naturaleza de la vía de administración y/o enfermedad particular a tratar.

The International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook de CTFA (2008), 12ª edición, describe una amplia variedad de ingredientes cosméticos no limitantes que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención.

Ejemplos de estos ingredientes, que pueden resultar útiles para los productos tópicos incluyen adsorbentes, emulsionantes, estabilizadores, lubricantes, disolventes, hidratantes (incluyendo, por ejemplo, emolientes, humectantes, formadores de la película, agentes oclusivos, y agentes que afectan a los mecanismos naturales de hidratación de la piel), repelentes de agua, vitaminas (por ejemplo, A, B, C, D, E, y K), extractos botánicos, agentes antimicrobianos, antioxidantes (por ejemplo, BHT y tocoferol), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA disódico y EDTA tetrasódico), y conservantes.

Ejemplos no limitantes de ingredientes farmacéuticos que también pueden utilizarse incluyen analgésicos, anestésicos, agentes antiinflamatorios, incluyendo fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos, antifúngicos, antivirales, antimicrobianos, activos contra el cáncer, agentes antipsoriásicos, agentes antiseborreicos, proteínas y péptidos biológicamente activos, agentes de tratamiento de quemaduras, agentes de cauterización, agentes protectores/de barrera cutáneos, esteroides incluyendo hormonas y corticosteroides, agentes para el tratamiento de heridas, agentes de cicatrización, etc.

E. Kits

Los kits también se contemplan para utilizarse en ciertos aspectos de la presente invención. Por ejemplo, un material o composición de la presente invención puede incluirse en un kit. Un kit puede incluir un recipiente. Los recipientes pueden incluir una botella, un tubo metálico, un tubo laminado, un tubo de plástico, una jeringa, un dispensador, un recipiente presurizado, un recipiente barrera, un envase, un compartimento, u otros tipos de recipientes tales como recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se guardan los materiales o composiciones. Un kit también puede incluir instrucciones de utilización del kit y/o composiciones. Las instrucciones pueden incluir una explicación de cómo aplicar, utilizar y mantener las composiciones.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar determinados aspectos de la invención. Los expertos en la materia han de apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan adecuadamente en la práctica de la invención.

Ejemplo 1

(AuNP funcionalizadas)

Las nanopartículas de oro (AuNP) que presentan un tamaño de diámetro medio de partículas de 20 nanómetros se funcionalizaron con 15 μM de 2-mercaptoetilamina (MEA). La espectrometría de FTIR confirma la presencia de los grupos funcionalizados en AuNP. Adicionalmente, la concentración óptima de MEA se determina mediante el uso de espectroscopia UV-Vis antes y después de la adición de un electrolito (NaCl al 10 %). La concentración óptima se definió como la concentración de MEA que estabiliza las AuNPs, previene la agregación y mantiene la dispersión incluso después de la adición de NaCl al 10 %. Como se muestra en la Fig. 2, el espectro UV/Vis se somete a un cambio en el pico de absorbancia cuando se funcionaliza con MEA. Los nanomateriales funcionalizados se mezclan entonces con 2 mM de EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) y 5 mM de sulfo-NHS (sulfo-N-hidroxisuccinimida) con el fin de facilitar la unión covalente a los grupos carboxilo en las fibrillas de colágeno.

Ejemplo 2

(Material conjugado de AuNP colágeno)

Para formar armazones en gel de AuNP colágeno, se añadieron 2,5 ml de colágeno de cola de rata (concentración de 9 mg/ml) a una mezcla de 0,5 ml 10x TFS, 0,057ml de NaOH 1M, 4,0 mg de EDC, 5,3 mg de sulfo-NHS y 0,5 ml de solución de AuNP funcionalizadas ($9,408 \times 10^9$ partículas). A continuación, la matriz se colocó en una incubadora a 37 °C durante 90 minutos para la polimerización y la reticulación. La relación entre el número de nanopartículas y la solución de colágeno es de $3,8 \times 10^9$ AuNP por 9 mg de colágeno de cola de rata.

La Fig. 3, que es una EEM de un armazón de gel de colágeno ejemplar con 20 nm de AuNP unidas a través de un agente de reticulación EDC/NHS de cisteína. EEM caracteriza la distribución y la densidad de las nanopartículas de oro en los armazones de gel de colágeno. Como se muestra en la FIG. 3 se presenta una EEM del material de AuNP colágeno a 100x, las AuNPs están presentes en todo el armazón, lo que indica que las AuNPs se unen a las fibrillas de colágeno. Los geles se someten a un lavado exhaustivo que elimina cualquier AuNP sin unir del armazón de colágeno (Haidekker (2006)).

Mientras que la micrografía SEM mostrada en la FIG. 3 confirma la unión de las nanopartículas, la Fig. 4 confirma que las partículas adheridas son partículas de oro. La Fig. 4 es una imagen de EDE (espectroscopia por dispersión de energía) de las nanopartículas de oro inmovilizadas mediante enlace covalente en el armazón de colágeno.

Ejemplo 3

(Ensayo de degradación)

Como se ha señalado previamente, los inventores creen que mediante el bloqueo de una parte de los sitios de unión a ácido carboxílico en las fibrillas de colágeno con partículas, se producirá una disminución de la actividad de la colagenasa y una disminución resultante en los índices de degradación de colágeno. Esto se ha confirmado experimentalmente (véanse los datos en la Fig. 5). Como se ilustra en la Fig. 5, se analizan y se comparan los efectos de los nanomateriales en la degradación de colágeno en diferentes concentraciones con las muestras sin nanomateriales. El tamaño del diámetro de las nanopartículas de oro (AuNP) era constante para cada muestra a 100 nm y el procedimiento por el cual se fabricó el material conjugado se describe en la Sección C ("Procedimiento para fabricar conjugados") de la descripción de las realizaciones ilustrativas de la presente memoria descriptiva, que se incorpora en este ejemplo por referencia. La concentración varió entre las muestras (1x, 2x, 4x). La concentración del agente de reticulación de longitud cero 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) también varió entre las muestras. El colágeno de cola de rata contenido en la muestra de control se reticuló por EDC (1x) sin nanopartículas. Se llevó a cabo un ensayo con colagenasa para ensayar la estabilidad biológica de las muestras reticuladas. La estabilidad biológica a través de la degradación de las muestras se midió por la cantidad de

liberación de hidroxiprolina. El porcentaje de la matriz degradada se indicó en relación al control (EDC 1x sin nanopartículas) en la Fig. 5. Las barras de error representan la desviación estándar calculada a partir de ocho muestras. Duplicando simplemente la concentración del agente de reticulación de longitud cero EDC disminuyó significativamente la degradación del armazón en 30 % ($p < 0,001$). La adición de nanopartículas de oro a la matriz también tuvo un efecto significativo disminuyendo la degradación de la matriz ($p < 0,001$). Una concentración 1x de 100 nm de nanopartículas de oro redujo la degradación en 50 %, mientras que una concentración 2x tan solo redujo significativamente la degradación en 7 % de ($p < 0,01$). No hay diferencias significativas entre AuNP (2x) y AuNP (4x), así como AuNP (1x) con un aumento de EDC en la concentración 2x. Los resultados indican que la adición de 100 nm de nanopartículas de oro ayuda en la resistencia proteolítica del colágeno y aumenta la estabilidad biológica de la matriz. Los resultados también indican que la unión de los nanomateriales a los sitios de unión a la colagenasa a lo largo de las fibrillas de colágeno disminuye el índice de degradación del armazón. Los resultados indican, además, que puede utilizarse un intervalo de nanomateriales de tamaños y formas, tales como nanobarras con diámetros comprendidos entre aproximadamente 20 y aproximadamente 1.000 nm.

Además, mediante la funcionalización de los nanomateriales con grupos amina (MEA), el número de enlaces formados entre el nanomaterial y el colágeno puede maximizarse. Adicionalmente, cada nanopartícula puede proporcionar múltiples (más de dos) sitios de unión, mientras que la mayoría de los agentes de reticulación generalmente proporcionan un enlace en dos puntos entre las fibrillas de colágeno. Este enfoque puede permitir la fabricación de los tamaños de los poros de la matriz de colágeno predeterminados específicos óptimos para el crecimiento tisular y la deposición de colágeno nativo. Dado que los nanomateriales de oro actúan como depuradores de radicales libres, el armazón también contribuirá a efectos antioxidantes mientras proporciona al mismo tiempo efectos antimicrobianos.

Otras proteínas pueden conjugarse con los nanomateriales para facilitar interacciones específicas una vez se inserten en el cuerpo. Por ejemplo, la fibrina puede añadirse al nanomaterial con MEA para ayudar a la coagulación de la sangre durante la cicatrización.

25 Ejemplo 4

(Ensayo de viabilidad celular)

La Fig. 6 proporciona datos que muestran el efecto de las nanopartículas de oro utilizadas en la viabilidad celular a través de un ensayo de viabilidad WST-1. En particular, los armazones de colágeno con nanopartículas de oro preparados en el Ejemplo 3 en concentraciones de 1x, 2x, 4x, y 8x se incubaron con células durante 3 días. La viabilidad de las células se determinó mediante la conversión de WST-1 a un valor de absorbancia registrado con UV-Vis. Los resultados mostrados en la Figura 3 indican que la viabilidad del control no es significativamente superior a la viabilidad celular en presencia de nanopartículas. Por lo tanto, los nanomateriales presentan una citotoxicidad muy baja. Con una mayor lectura de absorbancia de la concentración más alta de las nanopartículas de oro, se sugiere que había una renovación mayor de células en presencia de nanopartículas de oro para convertir más WST-1 o se satura el número de sitios de unión en una concentración 2x de AuNP dejando las nanopartículas de oro en los medios e interfiriendo con los valores de absorbancia UV-Vis.

Ejemplo 5

(Análisis de unión a ácido carboxílico)

Los armazones de colágeno preparados en el Ejemplo 3 se analizaron para determinar la cantidad de grupos ácido carboxílico libres restantes en los armazones. En particular, la espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier se utilizó en el armazón con y sin las partículas de oro. Esta técnica se utiliza para indicar una reducción en el pico en los sitios de ácido carboxílico que muestran la unión del oro a COOH en el colágeno. Como se ilustra en la Fig. 7, se observó una disminución en el pico en el área 1125-920 nm, que es indicativo de una reducción en el enlace C-OH (grupos COOH libres). El área bajo la curva varió de 0,3680 hasta 0,3, que es una disminución del 18 % en los grupos ácido carboxílico libres en el armazón conjugado de colágeno/partículas.

Ejemplo 6

(Evaluación de la celularidad *in vitro*, retención celular, y producción de la matriz extracelular).

El presente ejemplo proporciona datos que muestran los efectos del material conjugado de colágeno/partículas en la celularidad, viabilidad celular, producción de la matriz extracelular, y distribución celular en comparación con controles sin tratar.

Materiales y procedimientos

Asignaciones del grupo de armazón: Se evaluaron cinco combinaciones diferentes de nanopartículas de oro y geles de colágeno. Los grupos se numeraron de 1 a 5 y se describen en la Tabla 1. Se sembró un total de 10 construcciones con fibroblastos dérmicos y se incubaron durante 7 y 14 días. Se analizaron un total de 50 muestras.

Tabla 1

Grupo	Grupo 1: Control Colágeno + EDC	Grupo 2: Colágeno + EDC + 2x AuNP	Grupo 3: Colágeno + EDC + 1x AuNP	Grupo 4: Colágeno + EDC + 4x AuNP	Grupo 5: Colágeno + ½ EDC + 2x AuNP
Día 7	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
Día 14	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5

Recogida y cultivo de fibroblastos: La dermis de la piel se recogió de perros sacrificados por una sobredosis de barbitúricos por razones no relacionadas con el presente estudio. El tejido se colocó en medio de Eagle modificado de Dulbecco con suero fetal bovino al 10 %, tampón de Hepe al 0,008 %, aminoácidos no esenciales al 0,008 %, 100 UI/ml penicilina al 0,002 %, 100 ug/ml de estreptomina, 25 ug/ml de anfotericina B, L-ascorbato al 0,002 %, L-glutamina al 0,01 % (MEMD + SFB) para el transporte. El tejido dérmico se seccionó en partes de 2 mm x 2 mm utilizando una hoja de bisturí # 10 en una técnica estéril. Los fragmentos tisulares se combinaron con una solución de colagenasa clostridial Tipo IA estéril (Sigma, EE. UU.), en una concentración de 7,5 mg/ml de solución RPMI 1640. La mezcla se agitó en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 %, 95 % de humedad durante 6 horas. La solución digerida se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y el pellet celular se volvió a suspender en 5 ml de MEMD + SFB. Los matraces se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 %, 95 % de humedad con cambio en el medio estéril realizado cada 3 días. Los fibroblastos se controlaron para el crecimiento utilizando un microscopio invertido hasta una observancia del 95 % de confluencia celular por matraz de cultivo tisular. Las células se transfirieron a matraces de cultivo tisular de 75 ml mediante subcultivo hasta alcanzar el 3^{er} pase y después se congelan para su posterior uso. Las células se descongelaron posteriormente, se liberaron de la monocapa y se introdujeron en solución antes de su uso.

Siembra del armazón: Se formaron 250 µl de geles de colágeno en volumen aproximado a partir de cada uno de los grupos y tratamientos. Se colocaron diez (n=10) construcciones de cada grupo en pocillos individuales de una placa de cultivo tisular en TFS durante 24 horas, colocándose en incubadoras estériles a 37 °C, CO₂ al 5 %, 95 % de humedad como un acondicionamiento de preinmersión. Los cultivos microbianos y los análisis de sensibilidad previos no confirmaron crecimiento alguno después de 3 días de cultivo de las construcciones durante un periodo de 3 días. Tras la preinmersión, se eliminaron los medios de cada pocillo y se reemplazaron con la solución celular de fibroblastos en una concentración de 1 x 10⁶ células/ml. Las construcciones se cultivaron estáticamente con la solución celular durante 24 horas, momento en el que la solución celular se reemplazó con medios de cultivo MEMD + SFB durante la duración del estudio.

Siembra de la construcción y evaluación: Se recogieron cinco (n=5) construcciones de cada grupo en los días 7 y 14. Se recogieron secciones transversales de cada construcción para determinar la viabilidad celular y la evaluación de la distribución. La viabilidad celular se determinó usando el homodímero-1 de etidio (4 µl/ml de TFS) y tinción fluorescente de calceína AM (acetoximetiléster) (0,4 µl/ml TFS) (Kit de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD, Molecular Probes Co.) y el uso de microscopía ultravioleta. Se fabricaron secciones de un milímetro y se incubaron con los agentes de tinción durante 20 minutos a temperatura ambiente, se colocaron en un portaobjetos de microscopio de vidrio, se humedecieron con varias gotas de TFS, y se tificaron utilizando la técnica de doble marcado fluorescente. Las secciones se examinaron en un aumento de 10X. Las imágenes de cada sección se capturaron digitalmente por una cámara digital Olympus DP-70 (Olympus, Melville, NY) y se guardaron como archivos Tiff. El resto de cada construcción se liofilizó, se obtuvo un peso en seco y luego se mezcló con 1 ml de solución de papaína. Para determinar el contenido de GAG se utilizaron partes de cada digestión mediante los ensayos de azul de dimetilmetileno, y el contenido en colágeno para determinar las concentraciones de hidroxiprolina. La solución restante se incubó a 60 °C en un baño de agua durante 4 horas. Se utilizó el ensayo para la cuantificación del ADN bicatenario Quant-iT PicoGreen™ (Invitrogen) para determinar la celularidad del armazón restante. El ADN bicatenario extraído del timo bovino se mezcló con tampón TE (Invitrogen) para crear concentraciones convencionales de ADN de 1.000, 100, 10 y 1 ng/ml. Se añadieron los patrones y 100 µl de cada muestra digerida de papaína (utilizados en GAG y en ensayos de hidroxiprolina previos) a una placa de 96 pocillos. Se añadieron 100 µl de 2 µg/ml de reactivo Pico Green a cada pocillo y la placa se incubó durante 5 minutos. La fluorescencia de la muestra se leyó con una excitación de 485 nm/emisión de 528 nm por el lector de placas espectrofotométrico Synergy HT-KC-4 (BioTec, Winooski Vermont). Las absorbancias se convirtieron en concentraciones ng/l y el rendimiento del ADN bicatenario total se expresó en ng utilizando el software FT4 (BioTec, Winooski Vermont).

Cada conjunto de datos se analizó y los valores atípicos se determinaron por aquellos valores que eran superiores o inferiores a 2 desviaciones estándar fuera del conjunto de datos restantes, y esos valores se descartaron. Las diferencias en y entre los grupos se analizaron estadísticamente con un ensayo de ANOVA de una vía con diferencias entre los grupos individuales determinados por los diversos análisis de comparación post-hoc de todos los pares con significado estadístico establecido a p < 0,05.

Resultados

Evaluación del ADN bc como medida de celularidad: Como se ilustra en la Fig. 8, Día 7: el Grupo 1 poseía cantidades significativamente superiores de ADN que los grupos 2, 3 y 5. No se detectaron otras diferencias significativas. Día 14: el Grupo 2 poseía cantidades significativamente superiores de ADN que el grupo 5. No se detectaron otras diferencias significativas. Los Grupos 1 mostraron una disminución significativa en el contenido de ADN con el tiempo, mientras que los Grupos 2 y 3 mostraron un aumento en el ADN entre los dos intervalos de tiempo. No se detectaron otras diferencias significativas.

Evaluación de glicosaminoglicanos (GAG): Como se ilustra en la Fig. 9, Día 7: el Grupo 1 poseía cantidades significativamente superiores de GAG que el grupo 5. No se detectaron otras diferencias significativas. Día 14: el Grupo 2 poseía cantidades significativamente superiores de GAG que los grupos 1 y 5. No se detectaron otras diferencias significativas. El Grupo 1 mostró una disminución significativa en el contenido de GAG con el tiempo, mientras que los Grupos 2, 3 y 5 mostraron un aumento en GAG entre los dos intervalos de tiempo. No se detectaron otras diferencias significativas.

Evaluación de la viabilidad celular/integración: La viabilidad celular era subjetivamente > 95 % en todos los grupos en todos los intervalos de tiempo (Fig. 11). La balsa celular marcada resultó evidente en todos los grupos que hacían la cuantificación de la viabilidad específica imposible a través del análisis de imagen por ordenador debido a la enorme confluencia de celularidad viable. Ningún grupo demostró lo que se interpretaría como indicios de muerte celular. Cada grupo demostró la adhesión celular, la retención y la proliferación (Figura 12). El día 7, los grupos demostraron más evidencia de proliferación sobre la superficie celular en grandes balsas, mientras que el día 14 se presenció una penetración más profunda en el interior de las construcciones de gel de cada grupo. De modo subjetivo, ninguna diferencia puede detectarse en el grado o extensión de la penetración celular entre los grupos. En aquellas secciones en las que se presenciaron las cavidades asociadas a AuNP en el gel, se observó que la proliferación celular es abundante a lo largo de los canales (véanse Día 7, Grupos 2 y 5).

Conclusiones

Estos datos del Ejemplo 6 sugieren que aunque la celularización inicial de geles de colágeno parecía más óptima en los geles sin tratar, el análisis a largo plazo reveló que, en general, los grupos tratados con AuNP parecían retener las células o fomentar mejor su proliferación que las construcciones de gel sin tratar. Cabe señalar que estas observaciones se basan en gran medida solo en las tendencias según en el Día 14, la única diferencia estadística en cuanto al contenido de ADN entre los grupos era que el Grupo 2 poseía más celularidad que el Grupo 5. La diferencia de tratamiento entre estos dos grupos era duplicar la concentración de EDC en el Grupo 5 que puede conferir un efecto perjudicial en la retención o la proliferación celular. No obstante, examinando los dos intervalos de tiempo en cada tratamiento, el Grupo 1 es el único grupo que demostró una disminución significativa en la celularidad con el tiempo, mientras que los Grupos 2 y 3 mostraron aumentos. Aunque la mitogénesis o la proliferación celular no se analizó específicamente en este caso, este aumento de la celularidad en estos grupos era probablemente el resultado (en parte) del aumento de la celularidad ya que no se añadieron células adicionales en ningún intervalo de tiempo. Todos los grupos demostraron la capacidad de retener las células y favorecer su integración en el interior de las construcciones de gel con el tiempo sin indicios de muerte celular detectable. En base a los datos emparejados de ADN bc/viabilidad celular, parece que las células se retuvieron con menos éxito (pero no se sometieron necesariamente a cantidades cada vez mayores de muerte celular) en el Grupo 1 entre los días 7 y 14, revelando por consiguiente que los grupos tratados también favorecieron mejor la retención celular, en especial en los Grupos 2 y 3 (concentraciones de 1X y 2X AuNP). Este aumento de la celularidad era probablemente responsable de un gran aumento correspondiente en la producción de GAG del Grupo 2 en el Día 14. En lo que respecta al análisis de hidroxiprolina como determinante de la producción de colágeno, la actividad de los Grupos 1, 2 y 3 era muy similar en ambos intervalos de tiempo. Resulta interesante, que el Grupo 4 (4X AuNP) demostró niveles inferiores de concentraciones de HP, especialmente en el Día 14. El Grupo 5 mostró un pico inicial en el contenido de HP que disminuyó significativamente con el tiempo.

Todos los materiales, composiciones, o procedimientos desvelados y reivindicados en la presente memoria descriptiva pueden fabricarse y ejecutarse sin experimentación indebida a tenor de la presente descripción.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inyectable o implantable que comprende colágeno unido a partículas mediante enlace covalente, en la que los enlaces amida covalentes se forman entre los grupos ácido carboxílico libres de colágeno y los grupos amina reactivos de las partículas, y en la que las partículas presentan un tamaño de diámetro medio de partículas que oscila de 60 a 900 nanómetros.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el colágeno es reticulado, preferentemente en la que el colágeno reticulado es preferentemente poroso y tiene un tamaño de poro medio que oscila de 500 nanómetros a 200 micrómetros o de 1 micrómetro a 100 micrómetros, y en la que el colágeno es reticulado preferentemente a través de las partículas, en la que se forman al menos dos enlaces amida covalentes entre los grupos ácido carboxílico libres del colágeno y al menos dos grupos amina reactivos en al menos una partícula.
- 15 3. La composición de la reivindicación 2, en la que el colágeno es reticulado con un agente de reticulación de carbodiimida, en la que se utilizan preferentemente 2 a 4 mg de un agente de reticulación de carbodiimida por 30 mg de colágeno para formar los enlaces covalentes; o en la que se utilizan preferentemente 0,5 a 0,2 mg de un agente de reticulación de carbodiimida por 1×10^9 - 2×10^{10} partículas para formar los enlaces covalentes.
- 20 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que las partículas comprenden un material metálico, en la que el material metálico se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en oro, plata, platino, titanio, níquel y cobre.
- 25 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que las partículas comprenden un material cerámico o un material biodegradable.
- 30 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el grupo reactivo es mercaptoetilamina o cistamina o ambas.
- 35 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la relación de partículas en colágeno se encuentra en un intervalo de 1×10^9 partículas por mg de colágeno a 2×10^{10} partículas por mg de colágeno.
- 40 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además células madre embrionarias, células madre adultas, células madre pluripotentes inducidas, células epiteliales, células exocrinas o endocrinas, mioblastos, fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, células estromales, hepatocitos, células de los islotes, neuroblastos, queratinocitos, osteoclastos, osteocitos, células cardíacas, condrocitos, células endoteliales, o células musculares, o cualquiera de sus combinaciones.
- 45 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la composición es un gel, una solución, una pasta, o una estructura rígida deshidratada.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la composición está comprendida en una jeringa.
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la composición es un equivalente de la dermis o de la epidermis.
12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que 15 a 20 % de los grupos ácido carboxílico libres del colágeno se unen de manera covalente a las partículas a través de un enlace amida.
13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso en un procedimiento para incrementar el cartílago articular aumentando el volumen tisular en una persona, en la que la composición es formulada para una administración por inyección en una cápsula articular.
14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso en un procedimiento para rellenar huecos, defectos, o para aumentar el volumen tisular en una persona, en la que la composición se formula para una administración por inyección intradérmica o subcutánea.
15. Un procedimiento para reducir la degradación del colágeno *in vitro* mediante la degradación enzimática, que comprende conjugar colágeno con partículas que tienen grupos amina reactivos y que tienen un diámetro medio de partículas que oscila de 60-900 nanómetros, en el que los enlaces amida covalentes se forman entre los grupos ácido carboxílico libres del colágeno y los grupos amina reactivos en las partículas, y en el que la degradación del colágeno por la colagenasa se reduce de dicha forma, en el que dicho colágeno es inyectable o implantable.

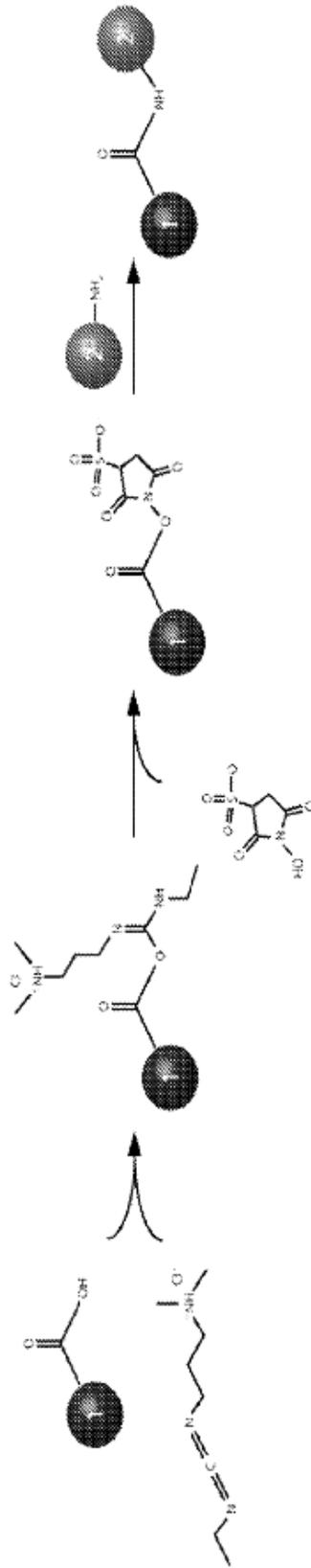


FIG. 1

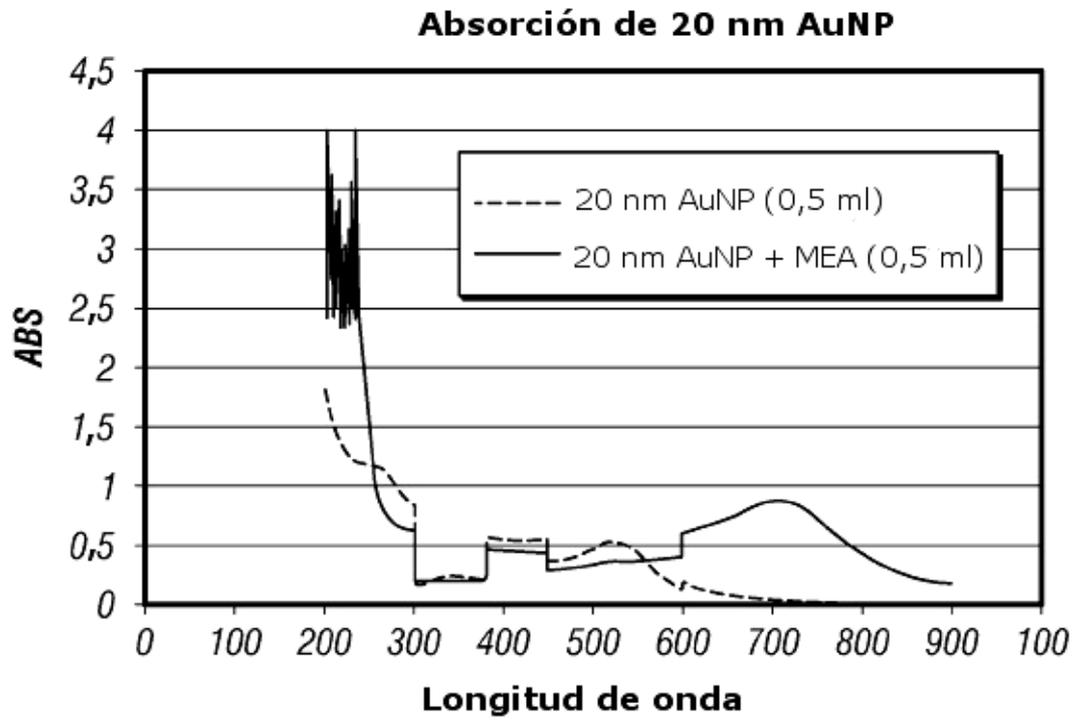


FIG. 2

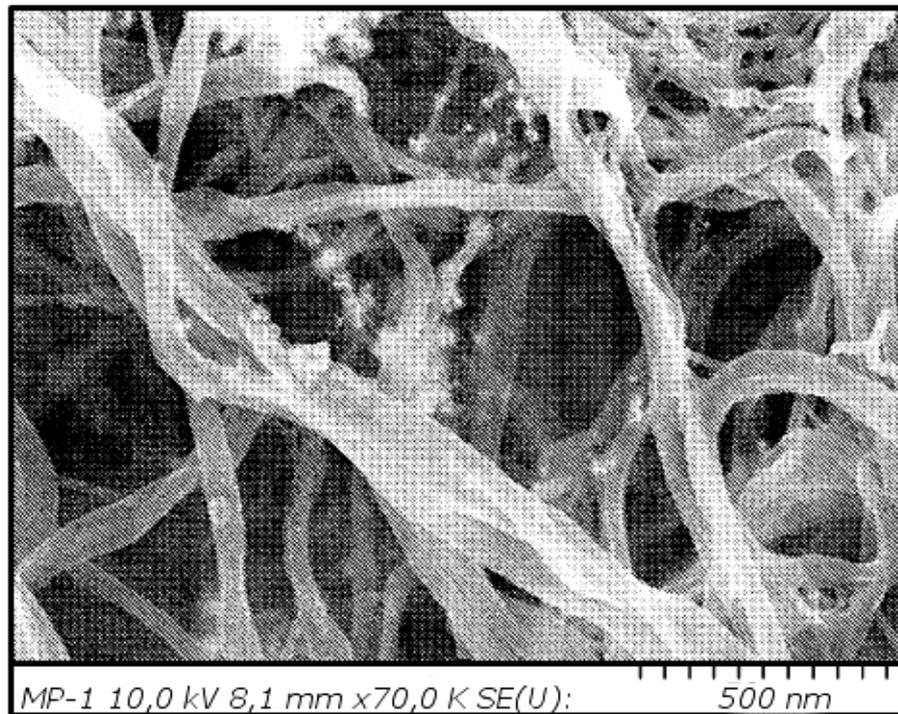


FIG. 3

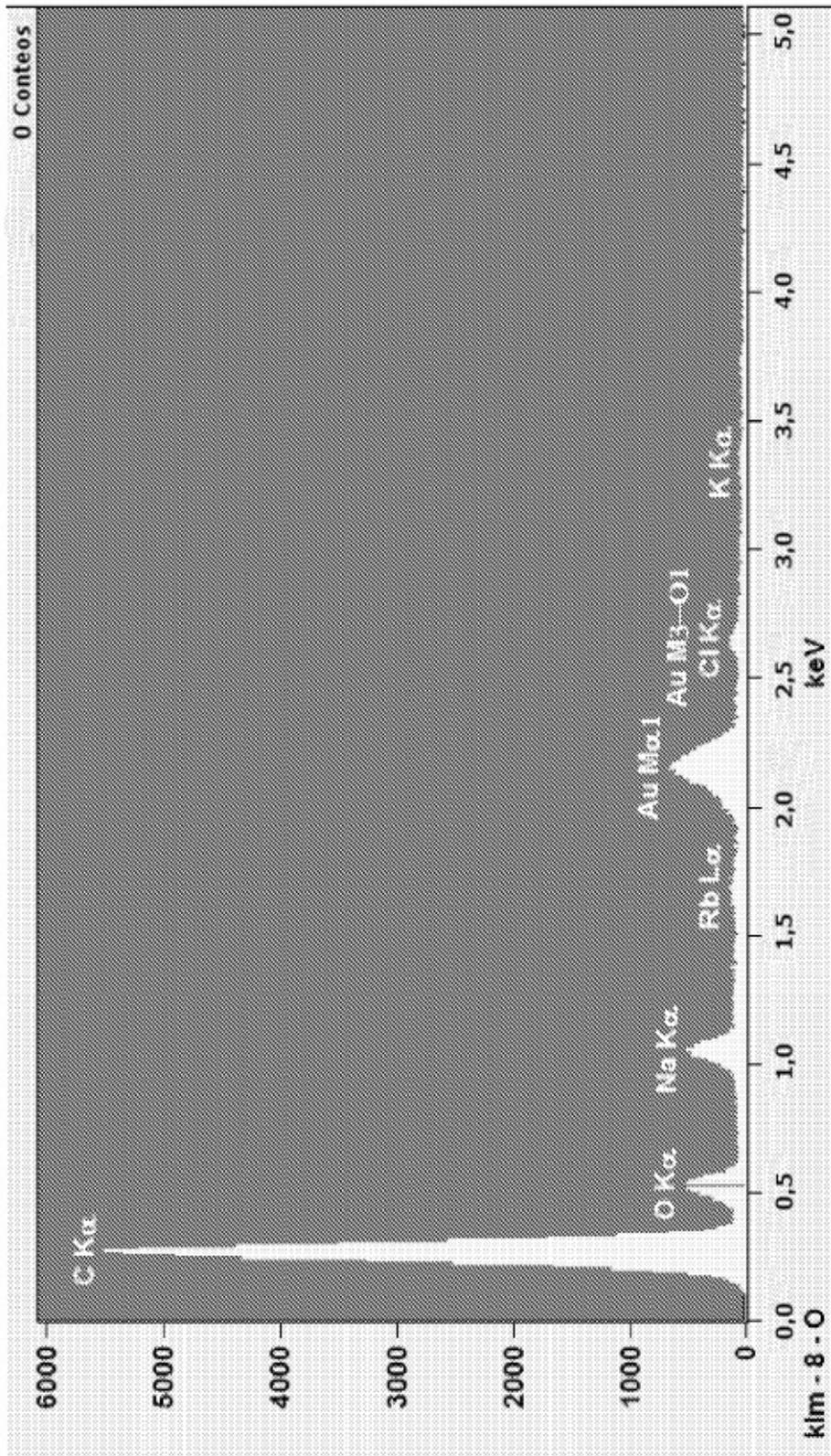


FIG. 4

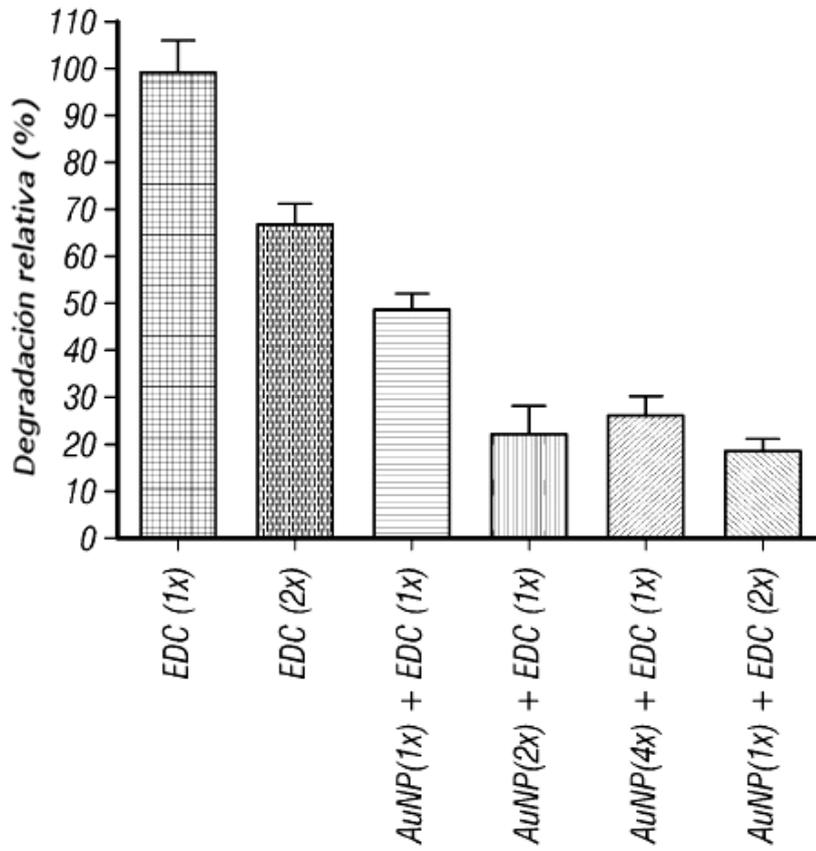


FIG. 5

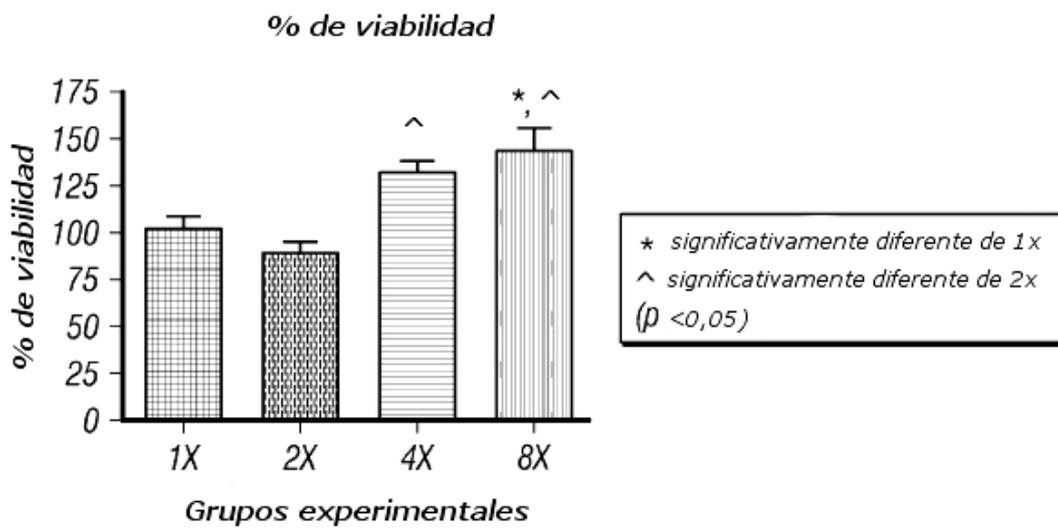


FIG. 6

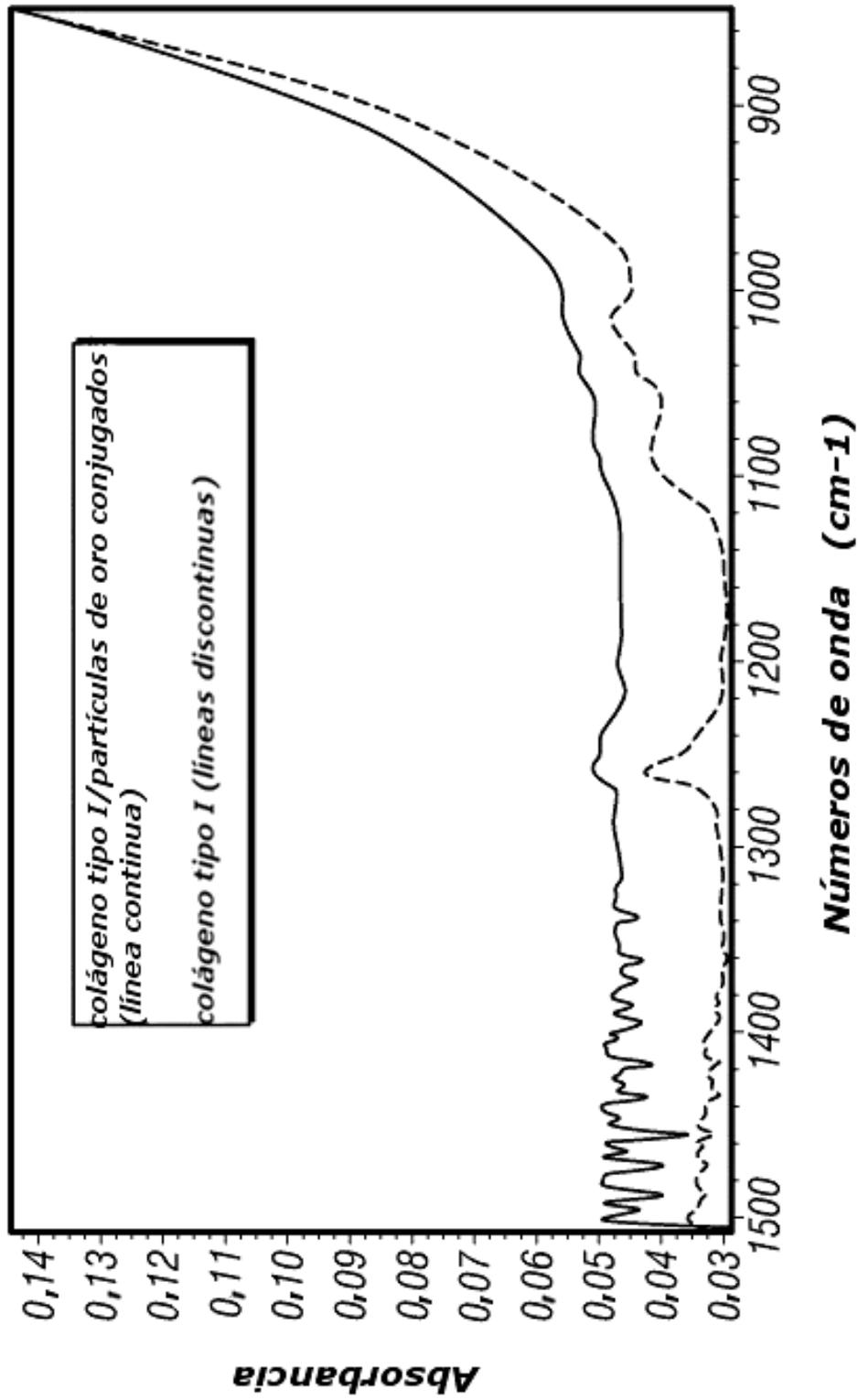


FIG. 7

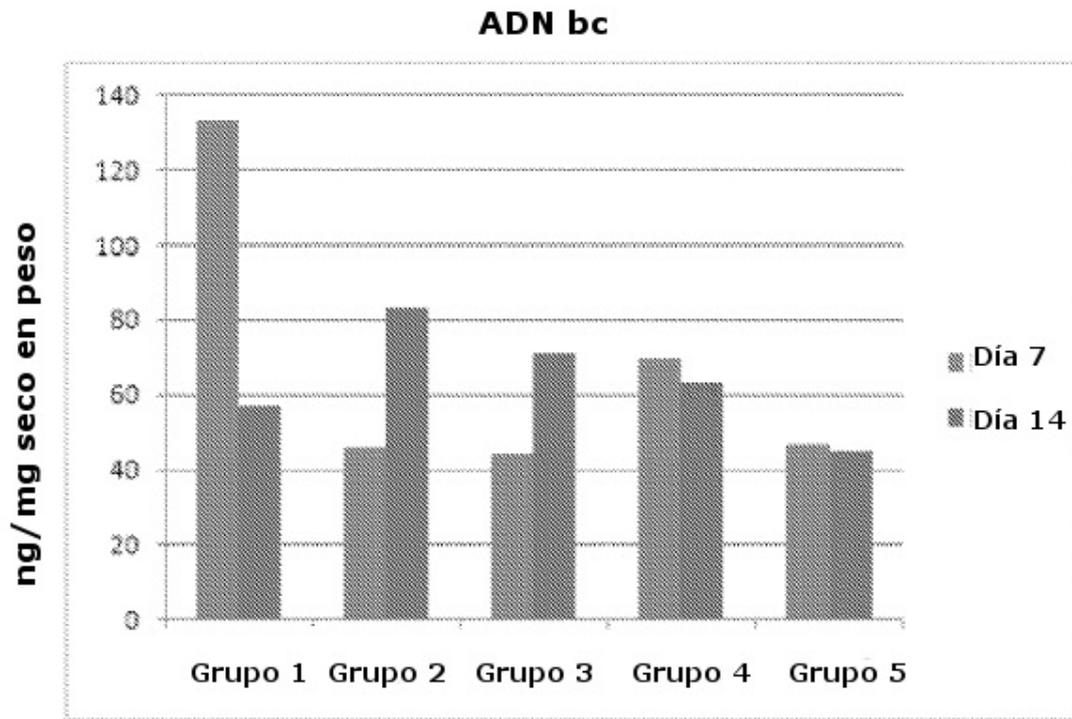


FIG. 8

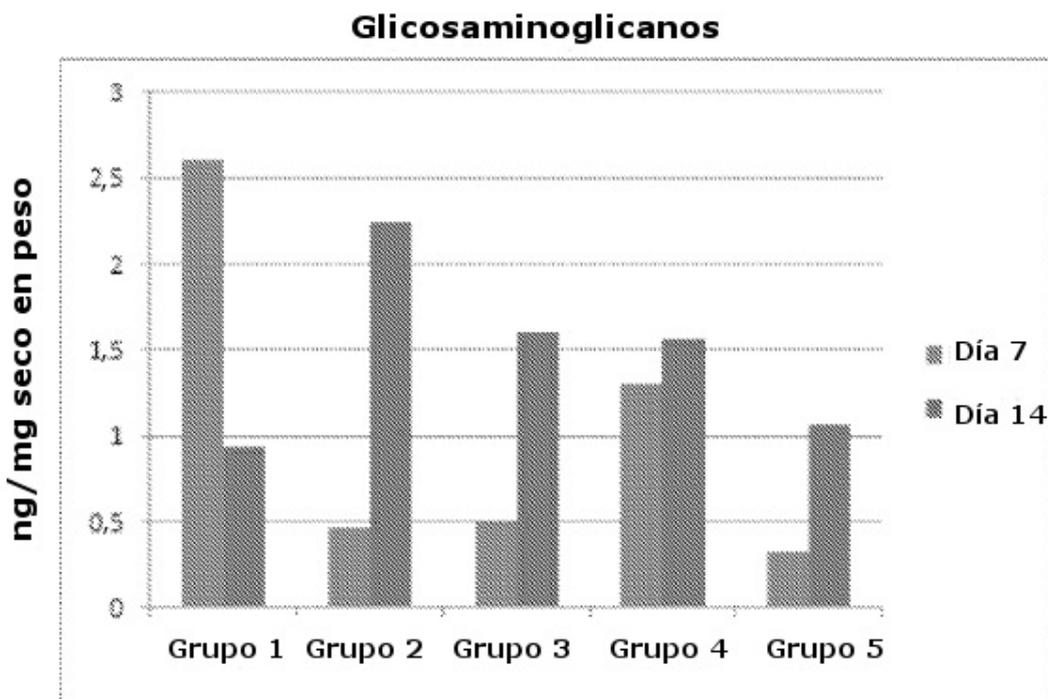


FIG. 9

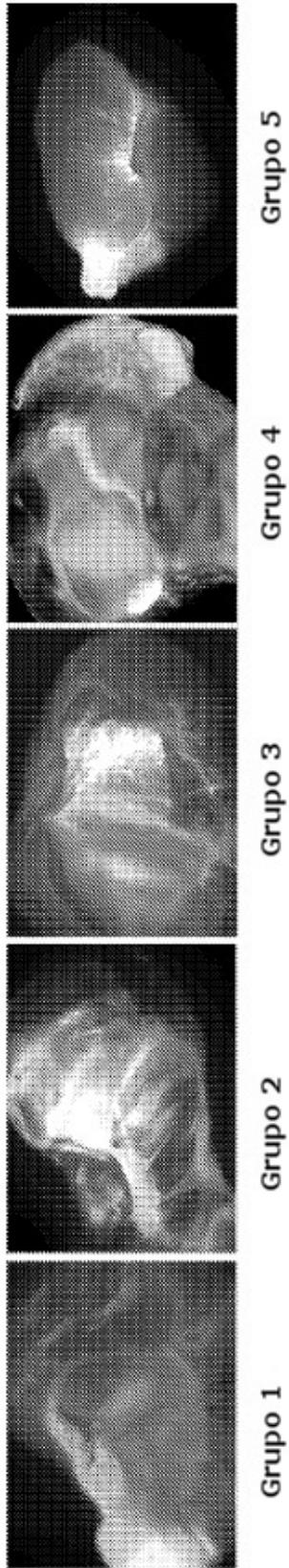


FIG. 10

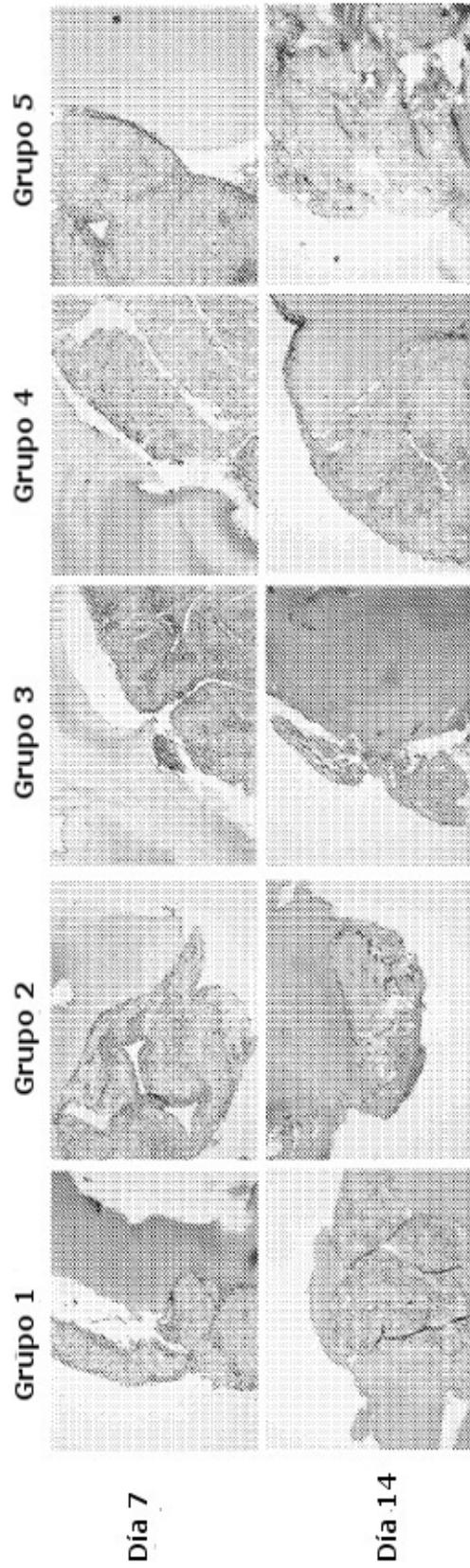


FIG. 11