

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 947**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61K 8/73 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2007** **PCT/EP2007/063384**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2008** **WO08068297**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2007** **E 07847872 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017** **EP 2152329**

54 Título: **Gel de ácido hialurónico para inyección intradérmica**

30 Prioridad:

06.12.2006 FR 0610645

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.09.2017

73 Titular/es:

MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA (100.0%)
Eckenheimer Landstrasse 100
60318 Frankfurt am Main, DE

72 Inventor/es:

PIRON, ESTELLE y
BOGDANOWICZ, PATRICK

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 632 947 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

Gel de ácido hialurónico para inyección intradérmica

- 5 La presente invención se refiere a implantes inyectables por vía subcutánea o intradérmica a base de ácido hialurónico.

El ácido hialurónico (HA) en su forma de ácido o su forma de sal (hialuronato) es el componente principal de la matriz extracelular. Está presente sobre todo en los tejidos conjuntivos denominados "blandos" en contraposición a
10 otros glicosaminoglicanos como el ácido condroitinsulfúrico presentes en los tejidos denominados "duros" tales como el cartílago. Por tanto se encuentra en cantidades importantes principalmente en la piel.

El HA es un glicosaminoglicano lineal no sulfatado compuesto por unidades de repetición de ácido D-glucurónico y de N-acetil-D-glucosamina (Tammi R., Agren UM., Tuhkanen AL., Tammi M. Hyaluronan metabolism in skin. Progress in Histochemistry & Cytochemistry. 29(2):1-81, 1994).
15

En la piel normal, el HA se sintetiza esencialmente por los fibroblastos dérmicos y los queratinocitos epidérmicos (Tammi R., citado anteriormente). Gracias a que sus residuos portan una carga negativa, el HA desempeña el papel de una bomba de agua que permite mantener la elasticidad de la piel. El HA desempeña un papel principal en el control de la difusión de los alimentos, de las hormonas, de las vitaminas y de las sales inorgánicas del tejido conjuntivo y en la recogida de desechos metabólicos que pueden inducir reacciones inflamatorias. Con la edad, la cantidad de HA y su grado de polimerización disminuyen, dando como resultado una disminución de la cantidad de agua retenida en el tejido conjuntivo. La piel experimenta entonces un proceso de envejecimiento que da lugar a un aumento de la fibrosis y una reducción del contenido en fibras elásticas. En la piel humana normal, el HA existe en
20 forma de polímero de alto peso molecular (600.000 - 1.000.000 Da). La degradación fisiológica de HA en la piel se realiza mediante (i) la internalización por los queratinocitos y (ii) la fragmentación intracelular en fragmentos de tamaño intermedio por las hialuronidasas (60.000-300.000 Da). El HA fragmentado se libera por los queratinocitos, atraviesa la membrana basal y se libera directamente en los vasos linfáticos (Tammi R. *et al.*, citado anteriormente).
25

El papel del ácido hialurónico (HA) en dermatología se conoce en numerosos campos incluidos el de la cicatrización, y de la hidratación. El ácido hialurónico actúa con la mayor frecuencia mediante sus interacciones con proteínas de unión y, sobre todo, con su receptor transmembrana CD44 (Tool B.P. 2001, Sem. Cell. Devel. Biol. 12: 79-87, Liao Y-H., Stuart A.J., Drug Delivery, 12: 327-342, 2005). La activación de este receptor se traduce en un papel de morfogénesis, en la multiplicación y la proliferación celular, la angiogénesis y la migración celular (G. Weindl, M.Schaller, Skin Pharm. Physiol. 2004; 17; 207-213). Los datos de la bibliografía sugieren que estas diferentes acciones serán en función del entorno de la célula, del peso molecular del ácido hialurónico y de su concentración. Por ejemplo, los componentes de alto peso molecular inhibirán la angiogénesis, mientras que los oligosacáridos la estimularán.
30

La solicitud de patente japonesa JP-11279042 pone de manifiesto, de manera tópica, una acción de fragmentos de ácido hialurónico (HAF) sulfatados (de masa molecular comprendida entre 1 y 50 kDa) que permitirá mantener la elasticidad de la piel y evitar la queratinización.
40

Un estudio reciente realizado con fragmentos de HA (de masa molecular de entre 50 y 750 kDa) de manera tópica, pone de manifiesto una reactivación de la síntesis de ácido hialurónico por los queratinocitos (solicitudes de patente FR 2865651, WO 2005/082327). Esta actividad de proliferación estará inducida por HAF de pesos moleculares precisos, actividad que no aparecerá con pesos moleculares superiores o inferiores.
45

En el sector de la estética, existen numerosos productos inyectables a base de ácido hialurónico. En mesoterapia, se usan disoluciones de vitaminas, de antioxidantes, de sales minerales o de ácido hialurónico. Las vitaminas están presentes para estimular y mantener el metabolismo celular, y reactivar así la producción de colágeno, los antioxidantes luchan contra el envejecimiento, las sales minerales serán indispensables en actividades enzimáticas celulares. Con respecto al ácido hialurónico, permite mantener el volumen y la hidratación de la piel, y crear una pantalla protectora frente a las degradaciones por radicales libres (H. Trommer, S. Wartewig, Int. Journ. Of Pharm. 254(2003) 223-234). A concentraciones suficientes, el ácido hialurónico creará un entorno óptimo para la proliferación celular, la neosíntesis de colágeno.
50
55

El estrés oxidativo generador de radicales libres a nivel de la dermis y de la epidermis es responsable del envejecimiento cutáneo y de la aparición de líneas, arrugas y tejidos flácidos.
60

Además, también se demostró que los radicales libres también son responsables de la despolimerización del ácido hialurónico *in situ*, lo que contribuye aún más a la flacidez de los tejidos y al envejecimiento prematuro de los mismos (Mendoza G., *et al*, Carbohydrate Research 342, 2007, 96-102).
65

La matriz extracelular (MEC) es una estructura dinámica que desempeña un papel estructural y regulador para los tejidos. La MEC está constituida por fibras de colágeno y de elastina y también por sustancia fundamental

(principalmente agua, sales minerales y proteoglicanos). Esta matriz confiere a la piel su turgencia y sus propiedades mecánicas de firmeza, elasticidad y tonicidad.

Las macromoléculas de colágeno son proteínas fibrosas formadas por tres cadenas polipeptídicas unidas por enlaces covalentes y de hidrógeno. Existen 19 tipos de colágeno, la mitad de los cuales se encuentran en la piel. La mayoría de los colágenos dérmicos pertenecen a los colágenos fibrilares de tipo I, III y V.

En los adultos jóvenes, la composición de la dermis es del 80% de colágeno de tipo I y el 20% de colágeno de tipo III; no obstante, esta relación se modifica con la edad debido a fenómenos de envejecimiento.

Las elastinas son proteínas organizadas en fibras en el interior de la dermis y aportan a la piel sus propiedades de elasticidad y de flexibilidad. Estas elastinas son ricas en aminoácidos de carácter hidrófobo.

La degradación de la MEC interviene en el transcurso de determinados procesos fisiológicos tales como la cicatrización, el desarrollo embrionario o la angiogénesis, pero también durante estados patológicos tales como artritis, artrosis o aterosclerosis o incluso durante etapas de progresión tumoral con la formación de metástasis (Fisher *et al*, 1997. N. England J. Med., 337, 1419-28; Shapiro, 1998. Current Opinions in Cell Biology, 10, 602-608).

Los componentes de la MEC se degradan principalmente por enzimas de tipo endopeptidasa denominadas metaloproteinasas de la matriz o MMP. Estas MMP participan activamente en procesos de cicatrización pero también contribuyen a la flacidez cutánea y a la aparición de arrugas que son los primeros signos del envejecimiento cutáneo. La familia de las MMP comprende aproximadamente 22 enzimas que se distinguen por la especificidad frente al sustrato que degradan.

La MMP-1, o collagenasa intersticial, degrada la triple hélice de los colágenos fibrilares de tipo III mayoritariamente pero también los colágenos I, II, VII, VIII y X.

La MMP-3 degrada por su parte glicoproteínas tales como fibronectina y laminina, determinados proteoglicanos, elastina, gelatina y los colágenos IV y V. Estas dos MMP se expresan al mismo tiempo por los queratinocitos y los fibroblastos.

En el sector del rellenado de arrugas, se inyectan geles de HA reticulado químicamente de manera intradérmica para rellenar la depresión ahondada por la arruga. La reticulación permite aumentar la permanencia del producto en el interior de la dermis. Así, si se inyecta el producto correctamente y según el perfil genético de cada persona, el producto permite un rellenado en de 4 a 6, incluso 8 meses. A continuación se absorbe totalmente en la dermis.

Tales geles a base de HA o HA reticulado permiten una reducción de la arruga por un efecto mecánico de rellenado de la depresión cutánea resultante de esta arruga. Estos productos sólo están dotados efectivamente de este efecto mecánico y no contribuyen en absoluto a ningún tratamiento ya sea preventivo o curativo frente al envejecimiento cutáneo y a la degradación de la MEC, esencial para el mantenimiento de las propiedades mecánicas de la piel tales como su elasticidad y su firmeza. Tales implantes, aunque permiten una desaparición de las líneas o arrugas, brindan un efecto limitado en el tiempo y sólo enmascaran parcialmente los efectos del envejecimiento intrínseco de la piel a nivel de sus estructuras de sujeción representadas por la MEC.

El documento FR 2733427 A describe composiciones bifásicas inyectables que encierran ácido hialurónico para el rellenado duradero de defectos de volumen de la piel, tales como arrugas o cicatrices.

Hasta el momento, se han usado varios productos en esta misma aplicación. Los geles o aceites de silicona son fáciles de aplicar, pero presentan el inconveniente de migrar a los tejidos situados justo por debajo de los puntos de inyección. Así, han aparecido fenómenos de inflamación crónica o de reacciones alérgicas. Además, la silicona no es biodegradable, y se encuentra en determinados órganos tales como el hígado. También se han propuesto diferentes suspensiones de partículas poliméricas, pero la mayor parte han provocado reacciones de rechazo, infecciones o inflamación. Finalmente, se han aplicado suspensiones de colágeno en el transcurso de los últimos años. Sin embargo, el colágeno se absorbe de manera relativamente rápida (entre 1 y 3 meses), y provoca determinadas reacciones alérgicas debido a su procedencia, generalmente de origen bovino o porcino.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de disponer de implantes inyectables que puedan realizar una acción de rellenado de arrugas pero también de revitalizar la dermis y la epidermis y de contribuir a limitar los procesos de senescencia celular que acompañan al envejecimiento cutáneo al tiempo que no presenten los inconvenientes citados anteriormente, o lo hagan de manera mucho menos pronunciada, todo ello acompañado por un aumento de la simplicidad y la comodidad en la aplicación.

Por tanto, la presente invención se refiere a un implante inyectable por vía subcutánea o intradérmica en forma de un hidrogel monofásico, caracterizado porque comprende, en peso, del 0,5% al 5%, preferiblemente del 0,5% al 4%, más preferiblemente el 2% de ácido hialurónico, y en el que:

- del 50% al 95%, preferiblemente del 60% al 90%, aún más preferiblemente el 85% en peso de ácido hialurónico está en forma de gel reticulado;

- del 5% al 50%, preferiblemente del 10% al 30 %, aún más preferiblemente el 15% en peso de ácido hialurónico está en forma libre, o en forma de una de sus sales fisiológicamente aceptables, de una masa molecular comprendida entre 500 y 2800 kDa, preferiblemente entre 750 y 2600 kDa, más preferiblemente entre 800 y 2500 kDa, aún más preferiblemente entre 1000 y 1500 kDa,

en un fluido portador fisiológicamente aceptable, estando comprendida la relación entre el peso de gel de ácido hialurónico reticulado y el peso de ácido hialurónico libre entre 1:1 y 1:0,05.

En una forma particular de la invención, el implante podrá comprender aproximadamente el 80% de ácido hialurónico reticulado y aproximadamente el 20% de ácido hialurónico libre, esto principalmente en el marco de una aplicación del implante según la invención al tratamiento de arrugas finas. En el caso de tratamiento de arrugas profundas, la cantidad de ácido hialurónico reticulado será preferiblemente de aproximadamente el 85% y la cantidad de ácido hialurónico libre de aproximadamente el 15%.

En el marco de la presente invención, por ácido hialurónico o HA se entiende un glicosaminoglicano lineal no sulfatado compuesto por unidades de repetición de ácido D-glucurónico y de N-acetil-D-glucosamina.

Se designa como hidrogel monofásico un hidrogel en forma de una sola fase homogénea.

Se designa como sal de ácido hialurónico fisiológicamente aceptable concretamente las sales de sodio y de potasio así como sus mezclas. Ventajosamente, la sal es la sal de sodio.

Ventajosamente, el gel constituido por ácido hialurónico reticulado según la invención tiene una viscosidad comprendida entre 200 y 2000 Pa.s, más particularmente entre 500 y 1800 Pa.s, más particularmente aún entre 1000 y 1800 Pa.s.

En el caso de un implante destinado al tratamiento de arrugas profundas, es decir que comprende el 85% de ácido hialurónico reticulado, la viscosidad del mismo se establece en aproximadamente de 1000 a 1500 Pa.s, particularmente de aproximadamente 1200 Pa.s. En lo que se refiere a un implante principalmente destinado a arrugas leves, y por tanto menos cargado de ácido hialurónico reticulado, es decir aproximadamente el 80% de ácido hialurónico reticulado, la viscosidad de un implante de este tipo se establece en aproximadamente de 200 a 500 Pa.s, más particularmente de aproximadamente en 350 Pa.s.

En la presente descripción, las viscosidades indicadas corresponden a valores medidos para una velocidad de cizallamiento de $0,01 \text{ s}^{-1}$.

Ventajosamente, el ácido hialurónico reticulado que constituye el gel según la invención tiene una masa molecular comprendida entre 1000 y 6000 kDa, más ventajosamente comprendida entre 1000 y 4000 kDa.

Según un aspecto ventajoso de la invención, el implante inyectable contiene además sulfato de condroitina.

Ventajosamente, la cantidad de sulfato de condroitina representa, en peso, entre el 0,05% y el 5% del peso total.

Ventajosamente, el sulfato de condroitina tiene una masa molecular comprendida entre 2 y 80 kDa, más ventajosamente entre 20 y 50 kDa.

El implante según la invención puede contener diversos aditivos habituales. Se citarán a modo de ejemplo los colorantes, los pigmentos colorantes, los aceites vegetales, los espesantes, los modificadores del pH, los agentes de ajuste de la osmolaridad.

El ácido hialurónico libre, o una de sus sales fisiológicamente aceptables, se distribuye ventajosamente de modo homogéneo en el interior del gel de ácido hialurónico reticulado.

El fluido portador es ventajosamente un tampón isotónico estéril libre de pirógenos.

El implante inyectable según la invención contiene además ventajosamente al menos otro principio activo usado en dermatocósmica.

Ventajosamente, el principio activo para dermatocósmica se elige de las vitaminas, los antioxidantes, las sales minerales, los antisépticos y el sulfato de condroitina.

En un aspecto particular de la invención, el implante inyectable contiene manitol que ejerce un efecto antioxidante a nivel de la dermis y contribuye a preservar el HA frente a una despolimerización inducida por los radicales libres

generados en el interior de la dermis por el estrés oxidativo. En efecto, se ha descrito que la asociación de manitol con HA mejora la protección frente a los daños inducidos por los radicales libres (Belda *et al*, 2005, J. Cataract Refract. Surg., 31: 1213-1218). Así, un aspecto de la presente invención es proporcionar un implante inyectable tal como se definió anteriormente y que contiene manitol como antioxidante.

Otro aspecto de la presente invención reside en el uso de manitol en el interior de un implante inyectable según la presente invención con el fin de proteger la dermis frente a los radicales libres y/o de limitar la despolimerización del ácido hialurónico contenido.

Por tanto, la invención también tiene como objeto el uso de ácido hialurónico en forma libre, o en forma de una de sus sales fisiológicamente aceptables, de una masa molecular comprendida entre 500 y 2800 kDa, preferiblemente entre 750 y 2600 kDa, más preferiblemente entre 800 y 2500 kDa, en presencia de un antioxidante, tal como manitol, aún más preferiblemente entre 1000 y 1500 kDa para la fabricación de un implante destinado a proteger la dermis frente a los radicales libres y/o a limitar la despolimerización del ácido hialurónico de la dermis y/o a prevenir el envejecimiento cutáneo.

El implante según la presente invención se inyecta en la dermis superficial, media o profunda.

Presenta la ventaja de poder provocar, desde el momento de la inyección, una reactivación fibroblástica al favorecer la proliferación celular y la neosíntesis de colágeno. La activación de los fibroblastos genera entonces una modulación de los mecanismos implicados en el remodelado de la matriz extracelular, lo que se traduce en una revitalización de la dermis.

El implante según la presente invención presenta la doble ventaja de obtener un efecto directo e inmediato de reducción de la arruga por rellenado mecánico de la depresión cutánea y un efecto indirecto durante un periodo más largo de regeneración celular mediante una estimulación de la síntesis de colágeno y una regulación de las MMP.

El ácido hialurónico reticulado contribuye directamente al efecto mecánico de rellenado y permite obtener, por su naturaleza reticulada, tal efecto de manera duradera durante periodos más largos que el HA no reticulado.

Además, el HA libre contenido en el implante según la invención inhibe la sobreexpresión de MMP-1 así como la sobreexpresión de colágeno III. Gracias a esta acción reguladora sobre MMP-1, contribuye a la limitación de la desestructuración y de la destrucción de la MEC, estructura esencial para el mantenimiento de las propiedades mecánicas de firmeza y de elasticidad de la piel.

Por otro lado, se demostró que la razón colágeno III/colágeno I aumentaba en el transcurso del envejecimiento cutáneo (Weber *et al*, 1984, J. Invest. Dermatol, 82, 156-60). Sabiendo que, en el marco de la presente invención, se constató que la fracción de HA libre tal como se usa en el implante según la invención inhibe la expresión del colágeno de tipo III sin afectar a la del colágeno de tipo I, puede pensarse de manera razonable que el implante según la invención es susceptible de restablecer la razón colágeno III/colágeno I medida en el interior de tejidos jóvenes.

Así, un objeto de la presente invención es usar un implante según la presente invención para la fabricación de un medicamento destinado a mantener y/o restablecer la razón colágeno III/colágeno I medida en tejidos jóvenes.

La asociación del HA libre de masa molecular comprendida entre 500 y 2800 kDa con el gel de HA reticulado tiene como consecuencia la hidratación y el mantenimiento del volumen de la piel, de modo inmediato. Además, induce una reactivación fibroblástica de la dermis, principalmente debido a la presencia de HA libre, y esta reactivación fibroblástica se prolonga en el tiempo a medida que se produce la degradación *in vivo* del gel de HA reticulado.

El implante según la presente invención puede representarse como una malla tridimensional constituida por HA reticulado que comprende en su interior moléculas de HA libres susceptibles de inducir una estimulación de los fibroblastos, de inhibir la degradación de la MEC por inhibición de las MMP y de regular la síntesis de colágeno orientándola hacia un estado correspondiente al observado en los tejidos jóvenes.

Estas moléculas de HA libres se liberan progresivamente desde esta matriz tridimensional de HA reticulado tanto por difusión pasiva como mediante la degradación temporal de la matriz de HA reticulado en el transcurso de semanas y meses tras la inyección. Esta liberación progresiva permite esta acción de rejuvenecimiento, de estimulación celular *in situ* mediante estas moléculas de HA libres que se preservan frente a la degradación biológica en el interior de dicha matriz a lo largo de las semanas y pueden ejercer así su acción durante un periodo más largo que si se inyectasen solas.

Así, un objeto de la presente invención es el uso de ácido hialurónico en forma libre, o en forma de una de sus sales fisiológicamente aceptables, de una masa molecular comprendida entre 500 y 2800 kDa, preferiblemente entre 750 y 2600 kDa, más preferiblemente entre 800 y 2500 kDa, aún más preferiblemente entre 1000 y 1500 kDa, distribuido en el interior de un gel de ácido hialurónico reticulado, para la fabricación de un implante subcutáneo destinado al

rellenado de arrugas y a la reactivación celular epidérmica y/o al mantenimiento de las propiedades mecánicas de firmeza y de elasticidad de la piel.

Por tanto, el implante según la invención combina el efecto mecánico del gel reticulado, que se hincha y remodela la arruga, con la acción biológica del HA libre.

La invención también tiene como objeto un kit que se presenta en forma de jeringa que contiene un implante inyectable tal como se describió anteriormente.

La invención tiene aún como objeto el implante tal como se describió anteriormente como medicamento.

La invención también se refiere al uso de un implante inyectable tal como se describió anteriormente para el relleno de líneas, arrugas, depresiones cutáneas y/o cicatrices que comprende la inyección subcutánea de un implante de este tipo.

El implante inyectable según la invención puede usarse para la preparación de un medicamento destinado a estimular el metabolismo epidérmico y dérmico y/o a reactivar la actividad celular epidérmica.

El implante inyectable según la invención puede usarse para la preparación de un medicamento destinado a estimular la actividad antioxidante de la dermis y/o a prevenir el envejecimiento cutáneo.

La invención también se refiere a un procedimiento cosmético de relleno de líneas y/o arrugas, que comprende la inyección de al menos un implante inyectable según la invención.

La invención también tiene como objeto un procedimiento de preparación de un implante inyectable tal como se describió anteriormente. Puede prepararse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la técnica, por ejemplo mediante un compuesto de diepoxi, concretamente el diglicidil éter de butanodiol (BDDE) o el 1,2,7,8-diepoxi-octano. Con una reticulación en medio básico, la concentración de compuesto de diepoxi puede variar, por ejemplo, entre el 5 y el 15% con respecto al ácido hialurónico para una reticulación al baño maría a 45-55°C durante de 1,5 a 6 h. El gel reticulado se purifica a continuación mediante técnicas clásicas del experto en la técnica: diferentes baños de agua desionizada, precipitación con alcoholes, diálisis... para eliminar las trazas de agente de reticulación residual. A este gel purificado se le añadirá HA de peso molecular adecuado, previamente hidratado en un tampón adecuado. Finalmente se desgasificará el producto terminado, se introducirá en una jeringa o cualquier otro recipiente adecuado y se esterilizará mediante tratamiento en autoclave.

Un procedimiento ventajoso según la invención comprende las siguientes etapas:

1) preparar un gel reticulado según las siguientes etapas:

- introducción de ácido hialurónico en un fluido básico,
- hinchamiento, homogeneización con agitación lenta y reticulación en caliente,
- neutralización e hinchamiento del gel reticulado en una disolución tamponada a pH de aproximadamente 7 con adición de agente de isoosmolarización,
- eliminación del agente de reticulación,

2) preparar un gel de ácido hialurónico libre mediante:

- introducción de ácido hialurónico en una disolución tamponada aproximadamente a pH 7, isoosmolar;
- hinchamiento,

3) mezclar el gel reticulado obtenido en la etapa 1) con el gel de ácido hialurónico libre obtenido en la etapa 2),

4) opcionalmente desgasificar y eventualmente acondicionar en viales o jeringas y después esterilizar.

Ventajosamente, el pH del gel tras la esterilización es de aproximadamente 7 y la osmolaridad de aproximadamente 250 a 350 mOsm, preferiblemente entre 300 y 320 mOsm.

Ahora va a ilustrarse la invención, de manera no limitativa, mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Caracterización de la actividad de HA de diferentes masas moleculares en:

- fibroblastos sanos;

- fibroblastos senescentes (mediante estrés oxidativo por H₂O₂).

5

La MMP-1 (o colagenasa 1) es una colagenasa intersticial que degrada la triple hélice de los colágenos fibrilares como los colágenos I y III. A nivel cutáneo, se expresa y secreta por los fibroblastos y los queratinocitos. La MMP-1 está implicada en el envejecimiento. En efecto, su sobreproducción en el transcurso del envejecimiento podría estar implicada en la pérdida de firmeza y de elasticidad, y la aparición de arrugas. Cuando se induce senescencia con H₂O₂, se observa en los fibroblastos un aumento muy grande de MMP-1. Por tanto, los principios activos que puedan reducir esta sobreproducción podrían tener propiedades "anti-edad".

10

Los fibroblastos se obtienen a partir de piel procedente de residuos quirúrgicos de sujetos jóvenes. Se lavaron las muestras en PBS y en etanol. Se cortaron pequeños trozos de piel y se distribuyeron en placas de cultivo y se sumergieron en un medio favorable para la proliferación de los fibroblastos (DMEM + 10% de FBS). En este medio, se añadió Primocin. Este es antibiótico, antifúngico y antimicoplasmas. Se incubaron las placas de cultivo.

15

Para inducir senescencia, se siembran los fibroblastos en placas de cultivo. 24 horas después, se añade el principio activo que va a someterse a prueba según la concentración apropiada, en DMEM. Después de 24 horas de incubación, se someten las células a un estrés oxidante. Se incuban durante 2 horas a 37°C, en una disolución de H₂O₂ 75 µM en PBS. Se trata de un estrés agudo que induce senescencia de las células. A continuación se ponen de nuevo los fibroblastos en DMEM completado con el 10% de FBS. 72 horas después del final del estrés, los fibroblastos han entrado en senescencia.

20

25

1.1. Protocolo de incubación.

Para los fibroblastos senescentes: se añaden los HA a una concentración final de 1 µg/ml, se dejan en reposo durante el estrés por H₂O₂, es decir 24 h de incubación. Para los fibroblastos sanos: también se incuban los HA durante 24 h a 1 µg/ml.

30

1.2. Extracción del ARN total con la ayuda del kit de extracción Rneasy (Qiagen) al final del experimento (D5, es decir 72 h tras el estrés).

35

1.3. Determinación del ARN total.

Se realiza la determinación cualitativa y cuantitativa del ARN total con la ayuda del kit de determinación RNA 6000 Nano LabChip y del aparato Bioanalyseur 2100 (Agilent). Se basa en el principio de la migración electroforética de las muestras en un nanochip. Se calcula la relación de los ARN ribosómicos 28S/18S; tiene valor informativo para evaluar la integridad del ARN. Además, se estima la pureza del ARN frente al ADN genómico.

40

1.4. Análisis de las tasas de transcripción mediante PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real permite cuantificar el nivel de expresión transcripcional de un gen de interés mediante amplificación del ADNc, obtenido mediante transcripción inversa, del ARNm del gen presente en el lisado celular. La mezcla de reacción está constituida por ADNc y por la mezcla de la pareja de cebadores de interés con una disolución de iQ SybrGreen Supermix (Biorad) que contiene, entre otras cosas, la Taq polimerasa y un agente intercalante del surco menor de las dobles hélices de ADN: Sybr Green (agente intercalante fluorescente). La reacción se realiza en el termociclador Icyler IQ (Biorad); se trata de una serie de ciclos de desnaturalización / hibridación / elongación.

45

50

1.4.1. Transcripción inversa: el ARN total se somete a "retrotranscripción" para dar ADNc con la ayuda del kit Reverse Transcription System (Promega) y del aparato Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

55

1.4.2. Medición de la tasa de transcripción de un gen de interés: se normaliza el nivel de expresión del gen de interés con respecto al nivel de expresión de genes de referencia, que varían poco con la senescencia. Se calcula el nivel de expresión del gen de interés según la fórmula: $2^{-(CT_{min}-CT)}$ donde CT significa "cycle threshold" (umbral de ciclo).

60

Se normaliza, con respecto a la expresión de los tres genes de referencia seleccionados, según el cálculo: $2^{-(CT_{min}-CT)} / \text{factor de normalización}$.

1.5. Resultados sobre la expresión de MMP-1.

65

Los fibroblastos que se volvieron senescentes mediante incubación con H₂O₂ expresaron 2,14 veces más MMP-1 que los fibroblastos normales (por tanto, se ha inducido correctamente la senescencia). En presencia de vitamina E

(control positivo), la sobreexpresión de MMP-1 por los fibroblastos senescentes se redujo en el 40%.

La sobreexpresión de MMP-1 se redujo en el 40% en presencia de HA de 450 kDa (10 µg/ml), en el 75% en presencia de HA de 800 kDa (10 µg/ml), en el 71% en presencia de HA de 1500 kDa (10 µg/ml), en el 83% en presencia de HA de 2600 kDa (10 µg/ml).

1.6. Resultados sobre la expresión del colágeno de tipo I y III

En los fibroblastos que se volvieron senescentes mediante incubación con H₂O₂, se midió una inhibición variable de la transcripción de colágeno de tipo I; no obstante, tal inhibición parece depender de los donantes. En uno de los donantes para el que la transcripción del colágeno de tipo I se inhibió en el 24% mediante estrés por H₂O₂, los diferentes HA de diferente tamaño no restauraron la síntesis de colágeno.

En los fibroblastos que se volvieron senescentes, se midió un aumento del +163% al +304% de la transcripción del colágeno de tipo III. En el donante para el que la transcripción del colágeno de tipo III se estimula al +304% mediante el estrés por H₂O₂, los HA libres de diferentes tamaños inhiben la síntesis de colágeno. El HA de 450 kDa inhibe en aproximadamente el 25%, mientras que los HA de masa superior a 800 kDa inhiben la transcripción en aproximadamente el 100%, recuperando niveles próximos a los de los fibroblastos jóvenes.

1.7. Conclusión.

Como conclusión de este experimento, parece que los HA ejercen una actividad anti-MMP-1 (es decir, antioxidante, teniendo por tanto potencialmente una actividad antiedad) en este modelo de senescencia inducida. Los HA de mayor masa molar (800, 1500 y 2600 kDa) parecen más eficaces que el HA de 450kDa.

En las condiciones experimentales presentes, los HA de masa molecular 450 kDa son activos sobre MMP-1. Los HA de masa molecular superior a 800 kDa, son más activos puesto que inhiben la sobreexpresión en del -75 al -83%.

Por otra parte, estos resultados muestran que los diferentes HA libres no actúan sobre la síntesis de colágeno de tipo I.

Finalmente, los HA libres inhiben la sobreexpresión de colágeno de tipo III, y esto es particularmente notable para los HA de masa molecular a partir de 800 kDa que inhiben la sobreexpresión en del -118 al -93%.

Así, debido a su acción reguladora sobre las MMP-1, los HA libres contenidos en el implante según la presente invención contribuyen a limitar la destrucción y la desestructuración de la MEC. Por otro lado, sabiendo que se ha demostrado que la relación colágeno III/colágeno I aumenta en el transcurso del envejecimiento, los HA contenidos en el implante según la invención permiten restablecer la razón medida en los tejidos jóvenes.

Ejemplo 2: Preparación de un implante según la invención.

2.1. Preparación de HA reticulado.

Se añadieron 5 g de hialuronato de sodio con un peso molecular de 1,6 MDa a sosa al 1% (35,6 g). Se deja en reposo la mezcla para la homogeneización discontinua durante 1 h 30 min. Se añadieron 315 mg de BDDE a la mezcla de HA/NaOH que se homogeneizó, se cerró y después se puso al baño maría a 50°C durante 2 h. Se neutralizó la mezcla mediante la adición de 5 g de HCl 1 N.

Se añadió el gel así obtenido a la concentración deseada mediante la adición de EDI y de sales que garantizan la isoosmolaridad, así como un pH neutro estable para dar un gel con 20 mg/g en cuanto a HA.

2.2. Preparación del implante.

A este gel purificado se le añade HA de 1,2 MDa, hidratado previamente en tampón fosfato. A los 226 g de gel reticulado obtenidos, se le añaden 60 g de gel de HA de 1,2 MDa, con una concentración de 20 mg/g. Se homogeneizan los 2 geles en una mezcladora clásica de paletas durante de 1 a 2 horas.

Finalmente, puede desgasificarse el producto terminado, llenarse en jeringas y esterilizarse mediante tratamiento en autoclave con vapor siguiendo un ciclo, por ejemplo, de 125°C durante 7 min, de 127°C durante 4 min o de 130°C durante 3 min.

Después de la esterilización, el pH del producto es de 7,1, la osmolaridad de 320 mOsm, y las caracterizaciones reológicas proporcionan un módulo de elasticidad G' de 45 Pa.s a una frecuencia de 1 Hz. Se determina que la concentración final del gel es de 19,8 mg/g (determinación con carbazol, método de la Farmacopea Europea), para una concentración prevista de 20 mg/g.

REIVINDICACIONES

1. Implante inyectable por vía subcutánea o intradérmica en forma de un hidrogel monofásico, caracterizado porque comprende, en peso, del 0,5% al 5%, preferiblemente del 0,5% al 4%, más preferiblemente el 2% de ácido hialurónico, y en el que:
 - del 50% al 95%, preferiblemente del 60% al 90%, aún más preferiblemente el 85% en peso de ácido hialurónico está en forma de gel reticulado;
 - del 5% al 50%, preferiblemente del 10% al 30%, aún más preferiblemente el 15% en peso de ácido hialurónico está en forma libre, o en forma de una de sus sales fisiológicamente aceptables, de una masa molecular comprendida entre 500 y 2800 kDa, preferiblemente entre 750 y 2600 kDa, más preferiblemente entre 800 y 2500 kDa, aún más preferiblemente entre 1000 y 1500 kDa,
- en un fluido portador fisiológicamente aceptable, estando comprendida la relación entre el peso de gel de ácido hialurónico reticulado y el peso de ácido hialurónico libre entre 1:1 y 1:0,05.
2. Implante inyectable según la reivindicación 1, caracterizado porque el gel constituido por ácido hialurónico reticulado tiene una viscosidad comprendida entre 200 y 2000 Pa.s, preferiblemente entre 1000 y 1800 Pa.s.
3. Implante inyectable según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ácido hialurónico que constituye el gel reticulado tiene una masa molecular comprendida entre 1000 y 6000 kDa, preferiblemente comprendida entre 1000 y 4000 kDa.
4. Implante inyectable según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el implante inyectable contiene además sulfato de condroitina, en el que el sulfato de condroitina tiene una masa molecular comprendida entre 2 y 80 kDa, preferiblemente entre 20 y 50 kDa.
5. Implante inyectable según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ácido hialurónico libre, o una de sus sales fisiológicamente aceptables, se distribuye de modo homogéneo en el interior del gel de ácido hialurónico reticulado.
6. Implante inyectable según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el fluido portador es un tampón isotónico estéril libre de pirógenos.
7. Implante inyectable según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque contiene además al menos otro principio activo usado en dermocosmética.
8. Implante inyectable según la reivindicación 7, caracterizado porque el principio activo para dermocosmética se elige de las vitaminas, los antioxidantes y las sales minerales, los antisépticos y el sulfato de condroitina.
9. Implante inyectable según la reivindicación 8, caracterizado porque el antioxidante es manitol.
10. Implante inyectable según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, como medicamento.
11. Kit que se presenta en forma de jeringa y que contiene un implante inyectable según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
12. Uso de ácido hialurónico en forma libre, o en forma de una de sus sales fisiológicamente aceptables, de una masa molecular comprendida entre 500 y 2800 kDa, preferiblemente entre 750 y 2600 kDa, más preferiblemente entre 800 y 2500 kDa, aún más preferiblemente entre 1000 y 1500 kDa, en presencia de un antioxidante, tal como manitol, para la fabricación de un implante destinado a proteger la dermis frente a los radicales libres y/o a limitar la despolimerización del ácido hialurónico de la dermis.
13. Uso de un implante inyectable según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o del kit según la reivindicación 11, para el rellenado de líneas, arrugas, depresiones cutáneas y/o cicatrices que comprende la inyección subcutánea de un implante de este tipo.
14. Uso de un implante inyectable según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la preparación de un medicamento destinado a estimular la actividad antioxidante de la dermis y/o a prevenir el envejecimiento cutáneo.
15. Uso de un implante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la fabricación de un medicamento destinado a mantener y/o restablecer la razón colágeno III/colágeno I medida en tejidos jóvenes.
16. Uso de ácido hialurónico en forma libre, o en forma de una de sus sales fisiológicamente aceptables, de una masa molecular comprendida entre 500 y 2800 kDa, preferiblemente entre 750 y 2600 kDa, más preferiblemente

entre 800 y 2500 kDa, aún más preferiblemente entre 1000 y 1500 kDa, distribuido en el interior de un gel de ácido hialurónico reticulado, en un implante subcutáneo para el rellenado de arrugas y para la reactivación de la actividad celular epidérmica y/o para el mantenimiento de las propiedades mecánicas de firmeza y de elasticidad de la piel y/o para la estimulación del metabolismo epidérmico y dérmico y/o para estimular la actividad antioxidante de la dermis y/o para prevenir el envejecimiento cutáneo.

5 17. Procedimiento cosmético de rellenado de líneas y/o arrugas, que comprende la inyección de al menos un implante inyectable según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

10 18. Procedimiento de preparación de un implante inyectable según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

1) preparar un gel reticulado según las siguientes etapas:

15 - introducción de ácido hialurónico en un fluido básico,
- hinchamiento, homogeneización con agitación lenta y reticulación en caliente,
- neutralización e hinchamiento del gel reticulado en una disolución tamponada a pH de aproximadamente 7 con
20 adición de agente de isoosmolarización,
- eliminación del agente de reticulación,

2) preparar un gel de ácido hialurónico libre mediante:

25 - introducción de ácido hialurónico en una disolución tamponada aproximadamente a pH 7, isoosmolar,
- hinchamiento,

30 3) mezclar el gel reticulado obtenido en la etapa 1) con el gel de ácido hialurónico libre obtenido en la etapa 2),

4) opcionalmente desgasificar y eventualmente acondicionar en viales o jeringas y después esterilizar.