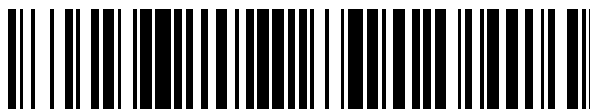


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 391**

51 Int. Cl.:

A61K 8/67 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2010** **E 13198504 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017** **EP 2727581**

54 Título: **Composición inyectable que combina un agente de relleno y un medio de crecimiento de fibroblastos**

30 Prioridad:

27.07.2009 FR 0955235

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.01.2018

73 Titular/es:

THOREL, JEAN-NOËL (100.0%)
3 Rue Larochelle
75014 Paris, FR

72 Inventor/es:

THOREL, JEAN-NOËL y
GATTO, HUGUES

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 648 391 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

Composición inyectable que combina un agente de relleno y un medio de crecimiento de fibroblastos

5 La presente invención se registra en el desarrollo de soluciones inyectables para el tratamiento de las arrugas.

La invención propone combinar un agente de relleno clásico, tal como ácido hialurónico, con un medio de crecimiento de fibroblastos de composición bien determinada, lo que permite una revitalización de la dermis.

10 Estado anterior de la técnica

La piel es un tejido en continua renovación, que comprende una pluralidad de células y estructuras especializadas. Dado su contacto permanente con el entorno, la piel representa una barrera protectora para el cuerpo. Además, está implicada en numerosos procesos fisiológicos que permiten que el cuerpo mantenga una temperatura fija y

15 constante. Además, la piel desempeña un papel importante en el sistema inmunitario que protege el cuerpo de las enfermedades.

A nivel estructural, la piel comprende tres capas:

- 20 - una capa externa, denominada epidermis,
- una capa interna, denominada tejido subcutáneo,
- y una capa intermedia, denominada normalmente dermis.

La epidermis humana natural está formada principalmente por tres tipos de células, es decir, los queratinocitos muy mayoritarios, los melanocitos y las células de Langerhans. La epidermis, como capa exterior, actúa como una

25 barrera contra los agentes externos.

La propia epidermis comprende 5 capas diferentes, desde la parte profunda a la superficie:

- 30 - la capa basal o estrato germinativo,
- la capa de Malpighi o estrato espinoso
- la capa granulosa o estrato granuloso,
- la capa transparente o estrato lúcido,
- y la capa córnea o estrato córneo.

35 La dermis, en sí misma, proporciona a la epidermis un soporte sólido y desempeña el papel de elemento rico en nutrientes con respecto a la segunda. La dermis está formada principalmente por fibroblastos y una matriz extracelular (MEC), formada en sí misma principalmente por colágeno, elastina y una sustancia conocida como "sustancia fundamental". El conjunto de estos componentes es sintetizado por los fibroblastos. En la dermis también

40 se encuentran leucocitos, hematocitos o incluso macrófagos tisulares. Además, esta está atravesada por vasos sanguíneos y fibras nerviosas.

Por último, el tejido subcutáneo o hipodermis es una capa de tejido adiposo y conectivo que cubre los nervios y los vasos sanguíneos principales.

45 En el curso del proceso de envejecimiento, aparecen diferentes signos característicos en la piel, lo que se traduce en una alteración de la estructura y de las funciones cutáneas. Los principales signos de envejecimiento de la piel son en particular la aparición de arrugas finas y/o arrugas, que aumentan con la edad. Estas arrugas pueden ser profundas, medias o superficiales y afectan en particular a los surcos nasolabiales, la zona periorbital, el contorno de los labios, frente, zona interiliar (arrugas del entrecejo). Estas arrugas y arrugas finas se traducen en una depresión

50 o en surcos en la superficie de la piel.

Las arrugas profundas se podrían deber a alteraciones dermo-hipodérmicas, mientras que las arrugas superficiales se podrían explicar por alteraciones dérmicas y posiblemente epidérmicas.

55 A menudo las arrugas se deben a la pérdida de elasticidad de la piel, en particular ha una flexibilidad de los tejidos, así como a la producción de arrugas finas de diferentes espesores. Cuando la dermis pierde su elasticidad, se debilita y comienza a formar arrugas más profundas. Durante la producción de arrugas, las fibras de colágeno, responsables de la elasticidad y de la estructura de la piel, pierden sus características, con una sobreproducción de enzimas de tipo metaloproteinasas. Esta cantidad anómala de enzimas degrada la matriz de colágeno y por lo tanto conduce a la producción de arrugas profundas. Por lo tanto, con el tiempo, la dermis tiende a ser más delgada, en particular al nivel de su capa de colágeno.

60

Otros factores, tales como los radicales libres, la exposición al sol, la contaminación, el tabaquismo, el consumo de alcohol o el ozono, pueden causar daños en la piel, mediante el mismo fenómeno de la activación de las metaloproteinasas y de descomposición del colágeno.

65

En el transcurso de estos últimos años, el tratamiento de las alteraciones cutáneas antiestéticas, relacionadas en particular con el envejecimiento, ha visto un auge importante y ha hecho enormes progresos.

5 Por lo tanto, se propusieron diferentes tratamientos, en particular la inyección de sustancias naturales o sintéticas, para remediar alteraciones cutáneas.

En particular se puede indicar la aplicación, en forma de inyecciones locales, de toxina botulínica desactivada (Botox®) o la aplicación de técnicas de láser, incluso su utilización en combinación.

10 Una alternativa a estas soluciones técnicas es la inyección en la dermis de productos de relleno, denominados "rellenos dérmicos". Este relleno se puede realizar con la ayuda de productos no reabsorbibles, tales como geles de poliacrilamida o partículas de polimetacrilato de metilo (PMMA). Sin embargo, estos componentes pueden causar reacciones de intolerancia de tipo inflamación o hipersensibilidad.

15 Por estas razones se ha considerado la utilización de productos reabsorbibles, tales como proteínas o grasas. Hasta la fecha, la solución técnica preferente es la aplicación de sustancias presentes en estado natural en el cuerpo humano, tales como colágeno o ácido hialurónico, que están en el origen de la mayoría de los productos disponibles actualmente en el mercado.

20 Estos productos reabsorbibles presentan sin embargo el inconveniente de ser degradados de forma bastante rápida en el organismo, lo que reduce su eficacia y requiere inyecciones repetidas y regulares.

A modo de ejemplo particular de producto natural reabsorbible, el ácido hialurónico es un compuesto preferente.

25 Se debe mencionar que el ácido hialurónico (HA) es un componente natural de la dermis, en la que desempeña un papel importante en la hidratación y elasticidad de la piel. Sin embargo su cantidad y calidad disminuye con la edad, causando sequedad y adelgazamiento de la piel que se ha poco. En la medida en la que el ácido hialurónico es además muy hidrosoluble y forma soluciones de alta viscosidad en agua, forma parte de los productos farmacéuticos más utilizados.

30 Hasta la fecha, el ácido hialurónico usado en los productos farmacéuticos o en los dispositivos médicos destinados al tratamiento de las arrugas se presenta en forma de un gel de hialuronato de sodio o de potasio. Sin embargo, estos geles de hialuronato de sodio o de potasio presentan capacidad de biorreabsorción bastante rápida (que por lo general varía entre 4 y 6 meses), que necesita que las inyecciones se repitan a intervalos cortos y regulares.

35 En un intento de aumentar la duración de la acción del ácido hialurónico, se desarrollaron formas estabilizadas de HA. En particular se trata de geles de HA reticulados químicamente. Esta reticulación, a través de puentes intra o intermoleculares, permitiría aumentar la persistencia del producto en el interior de la dermis. De manera alternativa, se ha previsto la encapsular del ácido hialurónico (WO2008/147817).

40 Además, los últimos desarrollos relacionados con los productos de relleno se concentraron en la combinación de diferentes principios activos en el contexto de la presente solicitud.

45 Por lo tanto, se prevé combinar el ácido hialurónico, actuando a través de efecto mecánico de relleno, con la administración cutánea de otras sustancias activas en este contexto. A modo de ejemplo, el documento WO2008/139122 combina el HA a un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico que se usa *in vivo* para asegurar una cierta conservación de las moléculas de HA inyectadas.

50 El documento US2009/202654 describe una composición destinada al rejuvenecimiento de la piel. El crecimiento de células de la piel se realiza en un medio de cultivo y a continuación el medio acondicionado de ese modo, que comprende factores de crecimiento, se recupera para su formulación en dicha composición.

55 Sin embargo parece que, a pesar de las diferentes alternativas disponibles en el mercado, siempre existe la necesidad de desarrollar soluciones técnicas que permitan asegurar una reparación cutánea eficaz, que perdure en el tiempo y que sea lo menos dolorosa posible para la piel.

Descripción de la invención

60 En este contexto, el Solicitante se ha registrado en un enfoque totalmente nuevo.

Aunque la técnica anterior recomendaba combinar un agente de relleno, tal como ácido hialurónico, con un agente protector del mismo, la presente invención propone actuar en dos niveles diferentes para restablecer una buena apariencia de la piel, en particular para luchar contra el envejecimiento.

Por lo tanto, se hace referencia a una composición (dermatológica, cosmética o terapéutica) de inyección, que combina a la vez un agente de relleno denominado mecánico, conocido como tal, y por el otro lado, un medio de crecimiento de fibroblastos.

En la práctica, por lo tanto se trata a la vez de actuar físicamente para rellenar las asperezas o surcos que forman las arrugas y por otra parte estimular el crecimiento de fibroblastos a nivel de la dermis. Los fibroblastos también pueden crecer dentro de los surcos y adicionalmente sintetizan sustancias tales como elastina y colágenos que favorecen la regeneración de la dermis. Además, el medio de crecimiento es susceptible de estabilizar y proteger el agente de relleno en cuestión.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición inyectable por vía subcutánea o intradérmica formada por:

ácido hialurónico o una de sus sales como agente de relleno, estando el ácido hialurónico en forma no reticulada; y un medio de crecimiento de fibroblastos libre de cualquier factor de crecimiento celular o de cualquier extracto biológico de origen animal o celular, no trazados y/o de composición indeterminada, comprendiendo dicho medio de crecimiento de fibroblastos:

- componentes de ácidos nucleicos,
- aminoácidos,
- azúcares sencillos y complejos,
- vitaminas,
- y una fracción inorgánica que contiene oligoelementos y sales minerales.

Por lo tanto, el primer componente de la combinación de acuerdo con la invención es un agente de relleno mecánico que tiene la función esencial de crear un volumen en el interior de las arrugas.

En la búsqueda de una solución técnica tan neutra como sea posible para la piel, denominada « biomimética », el ácido hialurónico no reticulados, así como sus sales fisiológicamente aceptables, se usa en la medida en la que esta molécula es un componente natural de la dermis. Por sales de ácido hialurónico fisiológicamente aceptables, se designan en particular a las sales de sodio y de potasio, así como sus mezclas.

De manera ventajosa, el ácido hialurónico representa de un 0,07 a un 3 % de la masa total de la composición, de forma ventajosa de un 0,8 a un 2,5 %.

Se debe indicar que el peso molecular del ácido hialurónico elegido puede depender de la aplicación a la que se dirige, en particular la profundidad de las arrugas a tratar.

Por lo tanto el segundo componente necesario de la composición de acuerdo con la invención es un medio de crecimiento de fibroblastos.

En el contexto de la presente invención, un medio de crecimiento de fibroblastos se define como un medio completo que permite no solamente el mantenimiento de los fibroblastos vivos, sino también la estimulación de su multiplicación. La realización de un ensayo funcional de crecimiento permite determinar si un medio dado corresponde a un medio de crecimiento de fibroblastos. En particular, un ensayo funcional adaptado bien conocido por el experto en la materia es el ensayo de observación de la densidad de las células vivas mediante métodos colorimétricos, usando el reactivo WST-1 y una lectura a 450 nm (Berridge, M. V. *et al.* (1996): The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. Biochemica 4, 15-19).

Un medio de crecimiento de fibroblastos está por ejemplo disponible en el mercado: se trata del medio de cultivo convencional DMEM (Sigma) suplementado con factor de crecimiento celular SVF (suero de ternera fetal), a nivel de un 10 % en masa.

De manera general, los medios de este tipo contienen extractos de origen animal o celular que efectivamente tienen un efecto estimulante en el crecimiento de los fibroblastos, pero que presentan el inconveniente de no tener una composición determinada o de contener elementos exógenos que no se pueden trazar tales como SVF, extractos de tallo pituitario de buey, factores de crecimiento celulares EGF (« factor de crecimiento epidérmico »), FGF (« factores de crecimiento de fibroblastos »), insulina o toxina del cólera, hidrocortisona, piperazina, ...

El medio de crecimiento de fibroblastos usado en el contexto de la presente invención no contiene factor de crecimiento celular o extracto biológico de origen animal o celular, si éstos no se trazan y/o no tienen composición determinada.

La expresión « no trazado » significa que la fuente de material biológico en cuestión y/o el tratamiento experimentado por la misma no se pueden establecer ni controlar.

En otros términos, dicho medio está desprovisto (libre) de extracto orgánico de origen animal o celular, de compuesto o factor de crecimiento celular o de una hormona.

Además, se trata de introducir mediante inyección en la dermis un medio de crecimiento de fibroblastos tan compatible como sea posible con la composición natural de la piel, es decir, un medio que comprende componentes biodérmicos (contenidos en el estado natural en la piel), biomiméticos y/o biocompatibles (elementos biológicos miméticos o neutros para la piel).

Por lo tanto y de acuerdo con otra característica, un medio de este tipo permite proporcionar específicamente a los fibroblastos un aporte nutricional optimizado en forma de vitaminas, oligoelementos, aminoácidos, sales minerales, azúcares simples (tales como glucosa, ribosa, desoxirribosa) y/o complejos (tales como HA), y componentes de ácidos nucleicos (bases nitrogenadas y pentosas necesarias para la formación de nucleótidos así como de nucleósidos). Además de forma ventajosa presenta características de pH (entre 6,5 y 7,9, de forma ventajosa entre 7,4 y 7,6 y de osmolaridad (entre 280 y 450 mOsm, preferiblemente entre 300 y 350 mOsm) fisiológicos.

Se debe indicar que el HA puede ser a la vez un ingrediente del medio de crecimiento y un agente de relleno. La diferencia radica a la vez en la forma del HA (necesariamente una sal de hialuronato en el medio) y su cantidad (cantidades mucho más pequeñas en el medio).

De acuerdo con un modo de realización en particular, todos los componentes del medio están presentes naturalmente en la piel (componentes dérmicos). Sin embargo, y para estimular el crecimiento de fibroblastos, tal medio se puede enriquecer con una sustancia exógena a la piel pero de origen natural, que se pueda trazar y de composición bien determinada. Una sustancia que responde a esta definición es, por ejemplo, una mezcla de péptidos extraídos de la leche o complejo MPC (« Complejo Peptídico de la Leche »), obtenido por precipitaciones sucesivas de la leche después de la separación de ciertas proteínas sometidas a hidrólisis enzimática. Esta sustancia se presenta en forma de un polvo deshidratado y de forma ventajosa se añade al medio en una proporción de 0,5 a 5 mg/ml, incluso de forma más ventajosa de 4 a 5 mg/ml.

De acuerdo con otro modo de realización preferente, el medio de crecimiento de los fibroblastos utilizado en la composición de acuerdo con la invención está desprovisto de EDTA y sus sales y/o ácido lipoico como agentes inhibidores de metaloproteinasas.

A modo de ejemplo, un medio complejo que responde a una definición de este tipo fue desarrollado por el Solicitante y corresponde a la combinación de sesenta componentes en cantidades exactamente definidas como sigue a continuación:

DENOMINACIÓN INTERNACIONAL NOMENCLATURA COSMÉTICA INGREDIENTE (INCI)	CONCENTRACIÓN FINAL Solución 1 X (en mg/l)
AGUA	c.s.p. 1 litro
CLORURO SÓDICO	5000 a 8000
L-GLUTAMINA o L-ALANIL-GLUTAMINA	100 a 3000
BICARBONATO SÓDICO	0 a 2000
D-GLUCOSA	2000 a 5000
HCL DE L-ARGININA	300 a 500
ACETATO SÓDICO	200 a 450
FOSFATO DISÓDICO Na ₂ HPO ₄	100 a 1500
L-LEUCINA	50 a 200
L-SERINA	50 a 200
CLORURO DE MAGNESIO MgCl ₂ , 6H ₂ O	50 a 200
CLORURO POTÁSICO	50 a 200
L-VALINA	20 a 150
PIRUVATO SÓDICO	10 a 75
HCL DE L-LISINA	10 a 75
HCL DE L-HISTIDINA, H ₂ O	10 a 75
HCL DE L-CISTEÍNA H ₂ O	10 a 75
ADENINA (HCl)	5 a 50

DENOMINACIÓN INTERNACIONAL NOMENCLATURA COSMÉTICA INGREDIENTE (INCI)	CONCENTRACIÓN FINAL Solución 1 X (en mg/l)
L-TREONINA	5 a 50
CLORURO CÁLCICO $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	0 a 22,5
MIO- INOSITOL	5 a 50
ÁCIDO L-GLUTÁMICO	15 a 75
L-ASPARAGINA H_2O	15 a 75
L-METIONINA	10 a 50
L-TIROSINA $2\text{Na}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	10 a 50
L-FENILALANINA	2 a 20
L-TRIPTÓFANO	2 a 20
L-ALANINA	5 a 30
GLICINA	5 a 30
L-ISOLEUCINA	5 a 30
ÁCIDO L-ASPÁRTICO	10 a 50
SULFATO SÓDICO	1 a 10
SULFATO FERROSO $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	1 a 10
ÁCIDO FÓLICO	1 a 5
TIMIDINA	0,1 a 3
CIANOCOBALAMINA	0,1 a 3
PANTOTENATO DE D-CALCIO	1 a 5
HCL DE TIAMINA	1 a 5
ÁCIDO TIÓCTICO	0,1 a 1
SULFATO DE CINC $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 a 0,5
SILICATO SÓDICO $\text{Na}_2\text{SiO}_3, 4\text{H}_2\text{O}$	0,05 a 0,5
HCL DE PIRIDOXINA	0,5 a 3
NIACINAMIDA (NICOTINAMIDA)	0,5 a 3
RIBOFLAVINA	0,05 a 0,5
d-BIOTINA	0,01 a 0,05
SULFATO DE COBRE $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0 a 0,005
MOLIBDATO DE AMONIO $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$	0 a 0,005
VANADATO DE AMONIO NH_4VO_3	0 a 0,001
CLORURO DE MANGANESO $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$	0 a 0,0001
HIALURONATO SÓDICO	100 a 1000
L-PROLINA	10 a 100
HIDROXIPROLINA	10 a 100
ÁCIDO ASCÓRBICO	0,1 a 10
ADENOSINA	0,01 a 1
GUANINA	0,01 a 1
DESOXIRRIBOSA	0,01 a 1
RIBOSA	0,01 a 1
CLORURO DE COLINA	0 a 3
MPC	0 a 5000

Como ya se ha mencionado, esta composición está destinada a ser inyectada y por lo tanto se puede comparar con un implante inyectable. Por lo tanto, un implante de este tipo está destinado a ser inyectado en la dermis superficial, media o profunda, de manera subcutánea o intradérmica, de forma ventajosa al nivel de la cara.

- 5 De acuerdo con un modo de realización ventajoso, la composición se presenta en forma de un gel, debido a la aplicación inyectable que forma parte del objeto de la invención. De manera notable, esta limitación es totalmente compatible con los medios de crecimiento de fibroblastos descritos anteriormente, que se pueden formular en forma de gel, gracias a la incorporación de HA, sin adición de excipientes exógenos.
- 10 Incluso de forma más ventajosa, la composición se presenta en forma de un hidrogel monofásico, es decir, un hidrogel en forma de una fase homogénea única. La viscosidad de la composición obtenida se puede ajustar fácilmente, en particular, mediante la adaptación de la composición y cantidad del agente de relleno. En el caso del ácido hialurónico, se puede jugar a la vez con la concentración por lo general varía entre un 0,07 % y un 3 % en peso de la composición, y también al nivel de su peso molecular.
- 15 La composición inyectable de acuerdo con la invención también puede ser el objeto de un kit que comprende además jeringas que pueden contener dicha composición. Por ejemplo se trata de jeringas de una sola dosis de 0,5 a 1,5 ml. En un kit de este tipo, los 2 componentes esenciales de la composición se pueden presentar como una mezcla en una misma jeringa, o en 2 jeringas distintas para la mezcla extemporánea.
- 20 Teniendo en cuenta los fines terapéuticos, una composición de este tipo se somete de forma ventajosa a esterilización, esterilización que se produce de forma ventajosa en frío con el fin de no desnaturalizar los componentes implicados. Esta etapa se puede realizar por ejemplo por filtración sobre membrana de 0,22 μ m para el medio de crecimiento de fibroblastos, y por esterilización separada de acuerdo con un proceso conocido por el experto en la materia para el HA.
- 25 Teniendo en cuenta su modo de acción complementario, los dos componentes de la composición de acuerdo con la invención se pueden administrar de forma simultánea, separada o repartida en el tiempo.
- 30 Como ya se ha mencionado, una composición de acuerdo con la invención está destinada a corregir todas las irregularidades de la piel, y en particular al tratamiento, a la mejora y/o la prevención del envejecimiento cutáneo. Por lo tanto se tiene como objeto las arrugas, arrugas finas, depresiones de fibroblastos y cicatrices, en particular al nivel de las zonas de la cara o de la frente marcadas con arrugas de expresión.
- 35 Una composición de acuerdo con la invención también se refiere tanto a dermatología, cirugía reparadora.
Por lo tanto, la presente invención tiene como objeto una composición tal como se ha descrito anteriormente para su utilización en el relleno de depresiones cutáneas o cicatrices. De acuerdo con otro aspecto, tiene como objeto un proceso cosmético de relleno de arrugas y/o arrugas finas que comprende la inyección de dicha composición.
- 40 Se debe indicar que la mezcla de los dos componentes esenciales de esta composición se puede hacer de manera extemporánea. Además, su inyección puede tener lugar de manera no simultánea.
- 45 Por lo tanto y de acuerdo con otro aspecto, la presente invención tiene como objeto una composición tal como se ha descrito anteriormente como producto de combinación para una utilización simultánea, separada o repartida en el tiempo, para la prevención o tratamiento de arrugas, arrugas finas, depresiones cutáneas y/o cicatrices.
- 50 Gracias a la composición particular de acuerdo con la presente invención, por lo tanto se tiene como objeto dos acciones fisiológicas complementarias y obtenidas: por una parte una acción mecánica de relleno de irregularidades, y también la acción de favorecer la renovación celular y de hecho, la síntesis de los componentes neo-sintetizados por los fibroblastos, en particular los colágenos y la elastina. Por lo tanto esto se traduce en una remodelación de la matriz extracelular y una revitalización de la dermis.
- 55 Por lo tanto, existe un fenómeno de relleno mecánico inmediato a partir de la inyección y un efecto, a la larga, de la regeneración celular. Por lo tanto se puede considerar la disminución de las concentraciones de agente de relleno en el transcurso del tratamiento. De hecho, una vez que el crecimiento de los fibroblastos toma el relevo, el agente de relleno mecánico se hace menos necesario y en la práctica, las cantidades de agente de relleno se pueden disminuir.
- 60 Además, una composición de este tipo es totalmente biocompatible con la piel, en la medida en que está formada esencialmente por componentes presentes de forma natural a nivel de la dermis. De hecho, ésta no altera el microentorno de la piel, reduciendo de ese modo los riesgos de reacciones inflamatorias o alérgicas. Por otra parte, se demostró que los medios biomiméticos y biocompatibles de este tipo permitían un crecimiento de fibroblastos estimulado en presencia de suero. Por lo tanto constituyen candidatos particularmente adecuados en el contexto de
- 65 una inyección dérmica, en la medida en la que la dermis está ricamente vascularizada.

A continuación la invención se mostrará de manera no limitante mediante los ejemplos siguientes, con el apoyo de las figuras adjuntas.

Leyendas de las figuras

La figura 1 ilustra el crecimiento comparado de fibroblastos humanos en cultivo en un medio de crecimiento de fibroblastos de acuerdo con la invención y el medio convencional DMEM (sigma), sin factor de crecimiento.

La figura 2 representa las tasas de colágeno en la dermis superficial y media de pieles sanas, alteradas mediante rayos UV y después del tratamiento con un medio de crecimiento de fibroblastos de acuerdo con la invención.

La figura 3 corresponde a cortes histológicos que muestran el marcado de fibras de colágeno en una piel sana, alterada por irradiación y después de tratamiento con un medio de crecimiento de fibroblastos de acuerdo con la invención.

La figura 4 ilustra la dosificación de elastina en las pieles sanas, a continuación alteradas mediante rayos UV y a continuación después de tratamiento con el medio de crecimiento de fibroblastos de acuerdo con la invención.

La figura 5 corresponde a cortes histológicos que muestran el marcado de fibras de elastina en una piel sana, una piel alterada por irradiación y a continuación tratada con el medio de crecimiento de fibroblastos de acuerdo con la invención.

La figura 6 representa las tasas de los GAG en la dermis superficial y media de pieles sanas, de pieles alteradas mediante rayos UV y después de tratamiento con el medio de crecimiento de fibroblastos de acuerdo con la invención.

La figura 7 corresponde a cortes histológicos que muestran el marcado de los GAG en una piel sana, una piel alterada por irradiación con UV y a continuación tratamiento con el medio de crecimiento de fibroblastos de acuerdo con la invención.

Ejemplos de realización

1/ Utilización de un medio de crecimiento de fibroblastos en una composición inyectable:

a) Composición del medio:

DENOMINACIÓN INTERNACIONAL NOMENCLATURA COSMÉTICA INGREDIENTE (INCI)	CONCENTRACIÓN FINAL Solución 1 X (en mg/l)
AGUA	c.s.p. 1 litro
CLORURO SÓDICO	5000 a 8000
L-GLUTAMINA o L-ALANIL-GLUTAMINA	100 a 3000
BICARBONATO SÓDICO	0 a 2000
D-GLUCOSA	2000 a 5000
HCL DE L-ARGININA	300 a 500
ACETATO SÓDICO	200 a 450
FOSFATO DISÓDICO Na ₂ HPO ₄	100 a 1500
L-LEUCINA	50 a 200
L-SERINA	50 a 200
CLORURO DE MAGNESIO MgCl ₂ , 6H ₂ O	50 a 200
CLORURO POTÁSICO	50 a 200
L-VALINA	20 a 150
PIRUVATO SÓDICO	10 a 75
HCL DE L-LISINA	10 a 75
HCL DE L-HISTIDINA, H ₂ O	10 a 75
HCL DE L-CISTEÍNA H ₂ O	10 a 75
ADENINA (HCl)	5 a 50

DENOMINACIÓN INTERNACIONAL NOMENCLATURA COSMÉTICA INGREDIENTE (INCI)	CONCENTRACIÓN FINAL Solución 1 X (en mg/l)
L-TREONINA	5 a 50
CLORURO CÁLCICO $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	0 a 22,5
MIO- INOSITOL	5 a 50
ÁCIDO L-GLUTÁMICO	15 a 75
L-ASPARAGINA H_2O	15 a 75
L-METIONINA	10 a 50
L-TIROSINA $2\text{Na}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	10 a 50
L-FENILALANINA	2 a 20
L-TRIPTÓFANO	2 a 20
L-ALANINA	5 a 30
GLICINA	5 a 30
L-ISOLEUCINA	5 a 30
ÁCIDO L-ASPÁRTICO	10 a 50
SULFATO SÓDICO	1 a 10
SULFATO FERROSO $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	1 a 10
ÁCIDO FÓLICO	1 a 5
TIMIDINA	0,1 a 3
CIANOCOBALAMINA	0,1 a 3
PANTOTENATO DE D-CALCIO	1 a 5
HCL DE TIAMINA	1 a 5
ÁCIDO TIÓCTICO	0,1 a 1
SULFATO DE CINC $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 a 0,5
SILICATO SÓDICO $\text{Na}_2\text{SiO}_3, 4\text{H}_2\text{O}$	0,05 a 0,5
HCL DE PIRIDOXINA	0,5 a 3
NIACINAMIDA (NICOTINAMIDA)	0,5 a 3
RIBOFLAVINA	0,05 a 0,5
d-BIOTINA	0,01 a 0,05
SULFATO DE COBRE $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0 a 0,005
MOLIBDATO DE AMONIO $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$	0 a 0,005
VANADATO DE AMONIO NH_4VO_3	0 a 0,001
CLORURO DE MANGANESO $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$	0 a 0,0001
HIALURONATO SÓDICO	100 a 1000
L-PROLINA	10 a 100
HIDROXIPROLINA	10 a 100
ÁCIDO ASCÓRBICO	0,1 a 10
ADENOSINA	0,01 a 1
GUANINA	0,01 a 1
DESOXIRRIBOSA	0,01 a 1
RIBOSA	0,01 a 1
CLORURO DE COLINA	0 a 3
MPC	0 a 5000

b) Cultivo de fibroblastos humanos

Protocolo

- 5 - Fibroblastos humanos sembrados a baja densidad en placas de 96 pocillos en medio de cultivo convencional DMEM, suplementado con factor de crecimiento celular SVF (Suero de Ternero Fetal);
- Después de 24 horas, cultivo en el medio de acuerdo con la invención puro o en el medio convencional DMEM sin factor de crecimiento;
- Ausencia de renovación de los medios en el transcurso del experimento;
- 10 - Densidad de las células vivas evaluada a T0 y a continuación después de 2, 4, 7 y 9 días, con método colorimétrico (reactivo WST-1).

Resultados

- 15 - El medio de cultivo de acuerdo con la invención permite mantener, solo, el crecimiento de los fibroblastos con un periodo de duración de 9 días. A partir del 7º día se observa una ralentización del crecimiento celular que se explica por la no renovación del medio (Fig. 1).
- En medio DMEM sin SVF, se observa una disminución de la viabilidad celular al cabo de 2 días y la ausencia de crecimiento celular a lo largo del estudio (Fig. 1).
- 20

En conclusión, se resalta que el medio de crecimiento de fibroblastos usado de acuerdo con la invención permite la supervivencia y estimular el crecimiento de fibroblastos humanos normales en ausencia de factores de crecimiento exógenos.

25 c) Ayuda en la reparación de los componentes de la dermis

Protocolo

- Fragmentos de piel tomados de 8 donantes, depositados en inserciones y colocados en medio de cultivo.
- 30 - Irradiación UVA a bajas dosis a J0 y J2 (reducción del metabolismo de los fibroblastos, alteración de las macromoléculas del tejido conjuntivo).
- Medio de acuerdo con la invención añadida en la superficie de la piel de J3 a J14 (papel empapado).
- Controles negativos sin irradiación (controles sanos) o sin aplicación del medio de acuerdo con la invención (UV solos)
- 35 - Análisis histológico (marcado):
- Colágeno (Rojo Sirius) y fibras elásticas (Catequina) > % de superficie ocupada a nivel de la dermis superficial y media (análisis de imagen asistida por ordenador).
 - Glucosaminoglucanos (GAG) (coloración de Hale) > puntuación semicuantitativa (intensidad del marcado).
- 40
- Dosificación bioquímica (espectrocolorimétrica):
- Colágeno total: sobre fragmentos de pieles después de digestión enzimática y trituración.
 - Elastina soluble: en los sobrenadantes de cultivo.
 - GAG: sobre fragmentos de pieles trituradas.
- 45

Resultados

- 50 - Reducción significativa de la cantidad de colágeno y de elastina en la dermis superficial y profunda, seguida de irradiación UV (Fig. 2 a 5).
- Aumento estadísticamente significativo del marcado del colágeno y de la elastina después de tratamiento con el medio de acuerdo con la invención (reparación de las fibras) (Fig. 2 a 5).
- Estimulación del metabolismo de los fibroblastos con el medio de acuerdo con la invención, con aumento significativo de la clasificación de elastina y tendencia al aumento de la tasa de colágeno (Fig. 2 a 5).
- 55 - Aumento significativo e importante de la cantidad de GAG totales en la dermis, seguido de la aplicación del medio de acuerdo con la invención (Fig. 6 y 7).
- Este modelo permitió cuantificar, sobre cortes histológicos, las propiedades de reparación del tejido conjuntivo del medio de crecimiento de fibroblastos usado.
- 60

En conclusión, se resalta que este medio estimula la reparación y la restauración de componentes esenciales de la dermis (fibras de colágeno, elastina, GAG) durante alteraciones tisulares.

2/ Preparación de una sal inyectable para el tratamiento de las arrugas:

- Medio de crecimiento de fibroblastos.
- HA añadido hasta un 3 % en peso de la composición total, de manera preferente con: un 0,8 % para el tratamiento de las arrugas superficiales, un 1,6 % para el tratamiento de las arrugas medias y un 2 % para el tratamiento de las arrugas profundas.
- Formulación de un gel: el HA se puso en solución en el medio de cultivo de fibroblastos. La concentración de HA de terminar la viscosidad de la preparación final. A modo de ejemplo, el HA utilizado es hialuronato sódico cuyo peso molecular está comprendido entre 1,3 y 1,8 MDa. El inyectable de acuerdo con la invención no comprende ningún aditivo, con el conjunto de los componentes de la fórmula desempeñando a la vez el papel de excipientes y de principios activos.
- Esterilización: mediante filtración sobre membrana de 0,22 µm para el medio de crecimiento de fibroblastos 0,22, y mediante esterilización separada de acuerdo con un método conocido por el experto en la materia para el HA.
- Protocolo de inyección: de acuerdo con la zona a tratar y la profundidad de las arrugas se prevén una o varias sesiones. Para mantener los resultados, puede ser necesario practicar retoques bianuales, con el relleno de las arrugas durando sobre todo porque la piel es más joven.

REIVINDICACIONES

1. Composición inyectable por vía subcutánea o intradérmica constituida por:
- 5 ácido hialurónico, o una de sus sales, como agente de relleno, estando el ácido hialurónico en forma no reticulada; y un medio de crecimiento de fibroblastos libre de cualquier factor de crecimiento celular o de cualquier extracto biológico de origen animal o celular, no trazados y/o de composición indeterminada, comprendiendo dicho medio de crecimiento de fibroblastos:
- 10 - componentes de ácidos nucleicos,
 - aminoácidos,
 - azúcares sencillos y complejos,
 - vitaminas,
 -y una fracción inorgánica que contiene oligoelementos y sales minerales.
- 15 2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que el ácido hialurónico representa de un 0,07 a un 3 % en peso de la composición.
- 20 3. Composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que el medio de crecimiento de fibroblastos comprende además una mezcla de péptidos de leche (MPC).
4. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que se presenta en forma de un gel.
- 25 5. Kit que se presenta en forma de jeringas que contienen una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización en el relleno de depresiones cutáneas o de cicatrices.
- 30 7. Proceso cosmético de relleno de arrugas y/o arrugas finas, que comprende la inyección de la composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4.
- 35 8. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, como producto de combinación para una utilización simultánea, separada o repartida en el tiempo, para la prevención o el tratamiento de arrugas, arrugas finas, depresiones cutáneas y/o cicatrices.

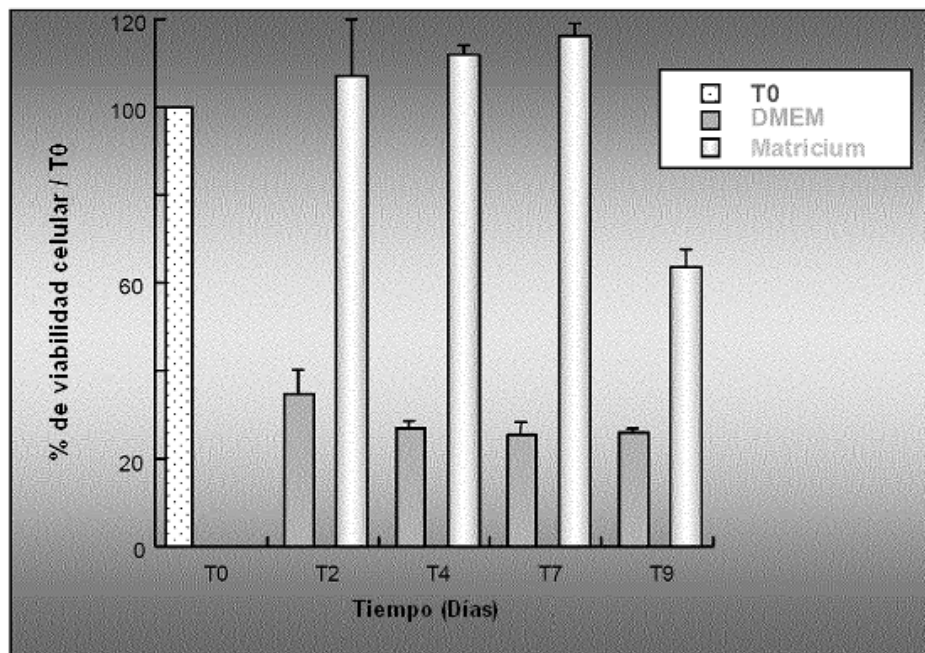


Figura 1

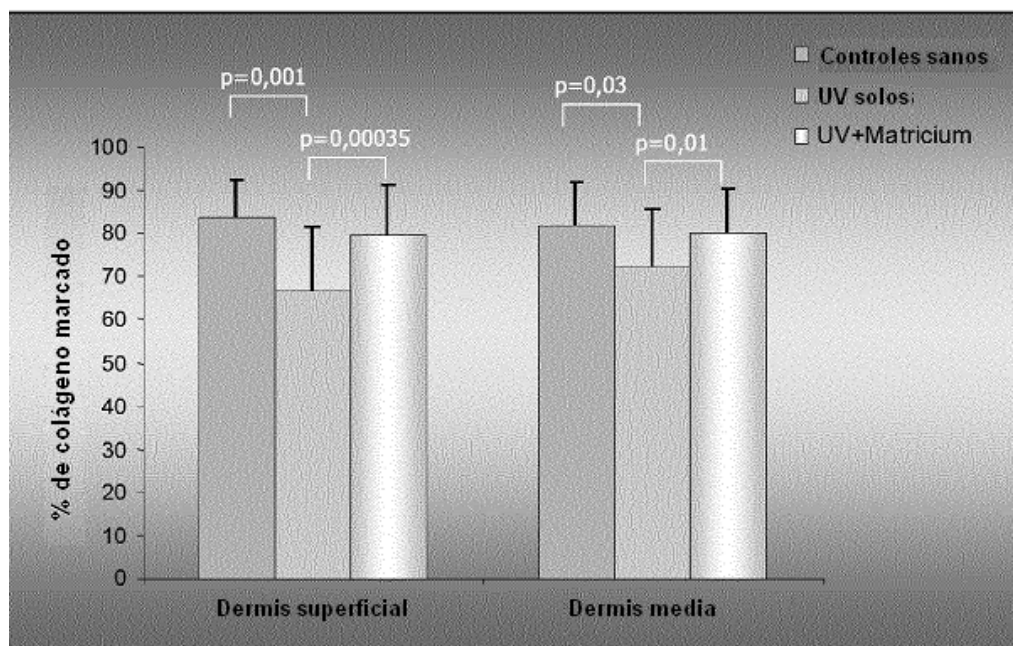


Figura 2

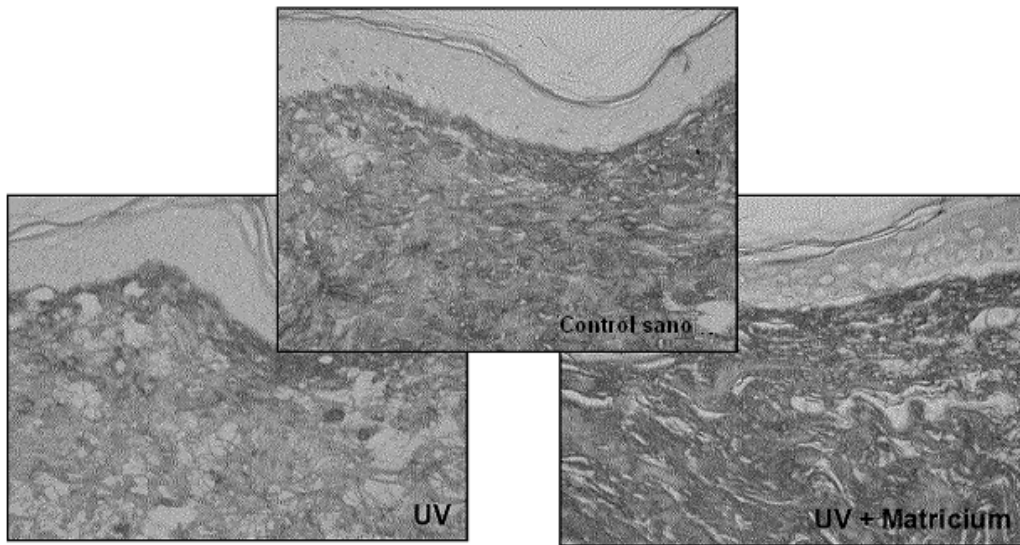


Figura 3

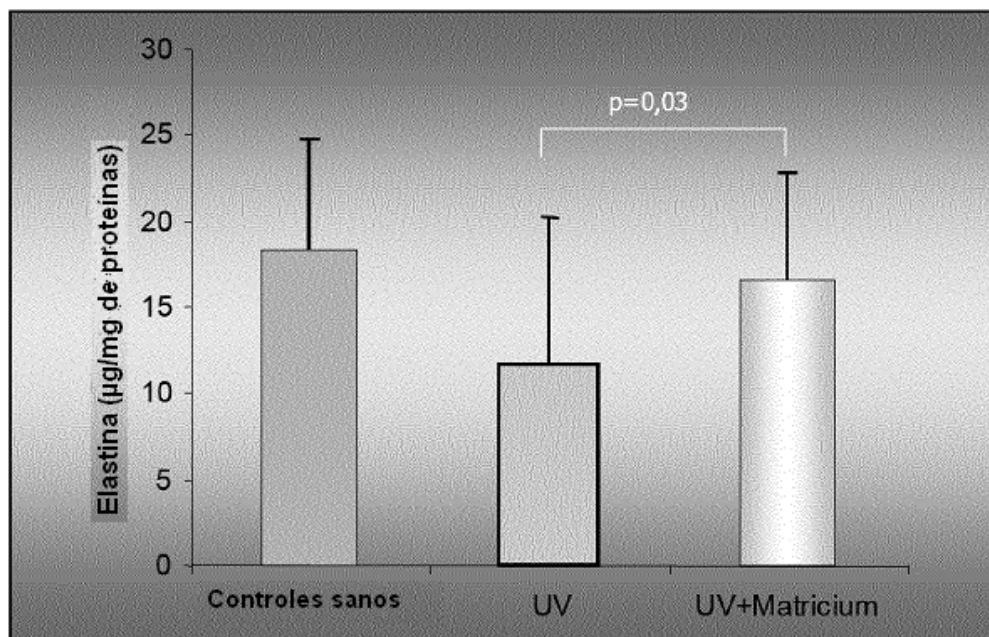


Figura 4

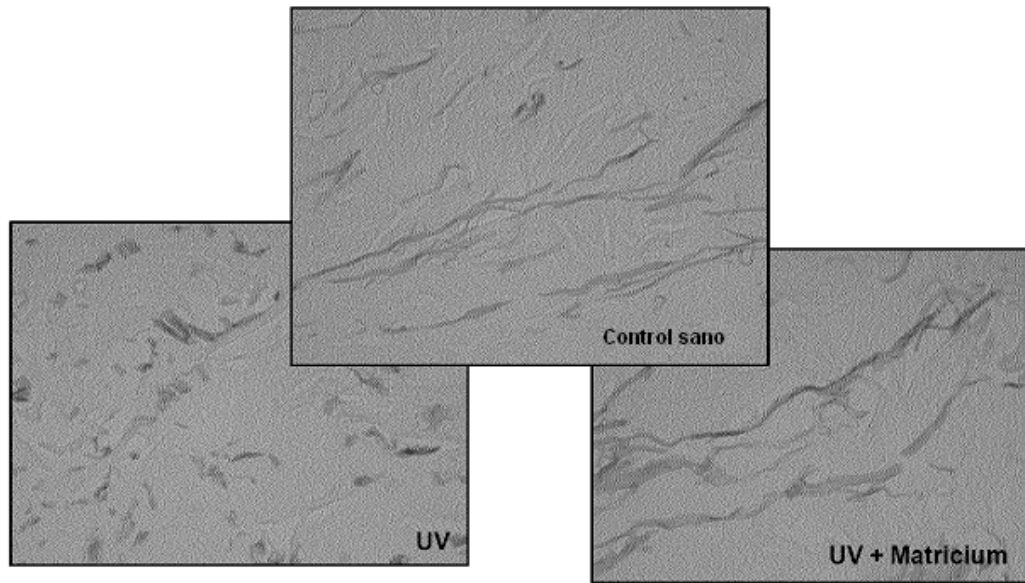


Figura 5

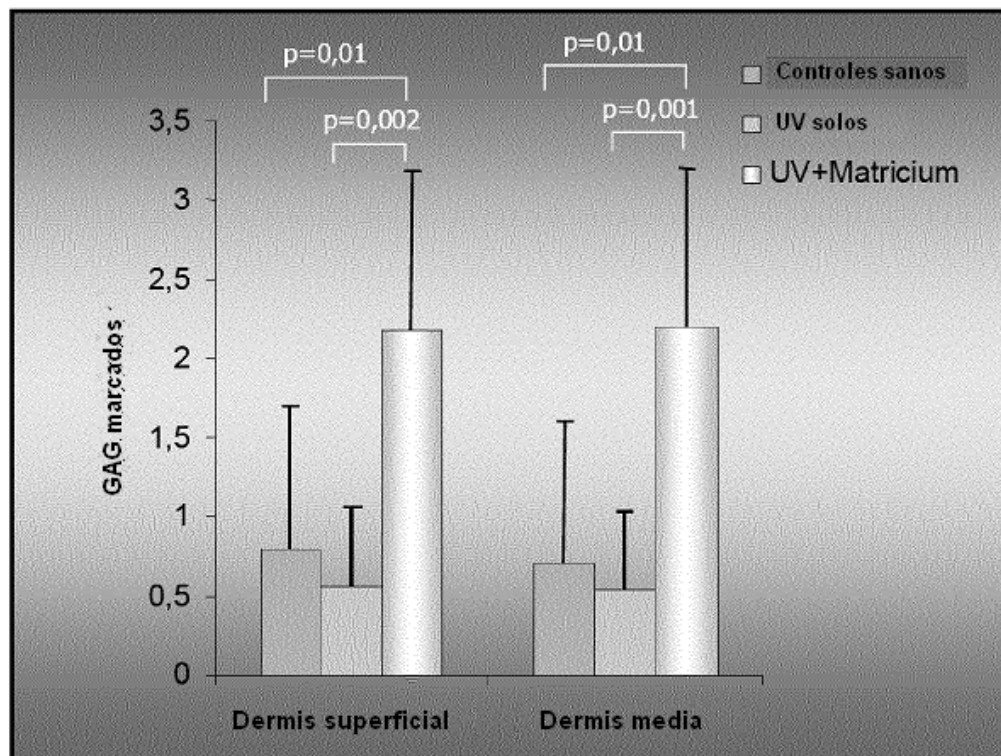


Figura 6

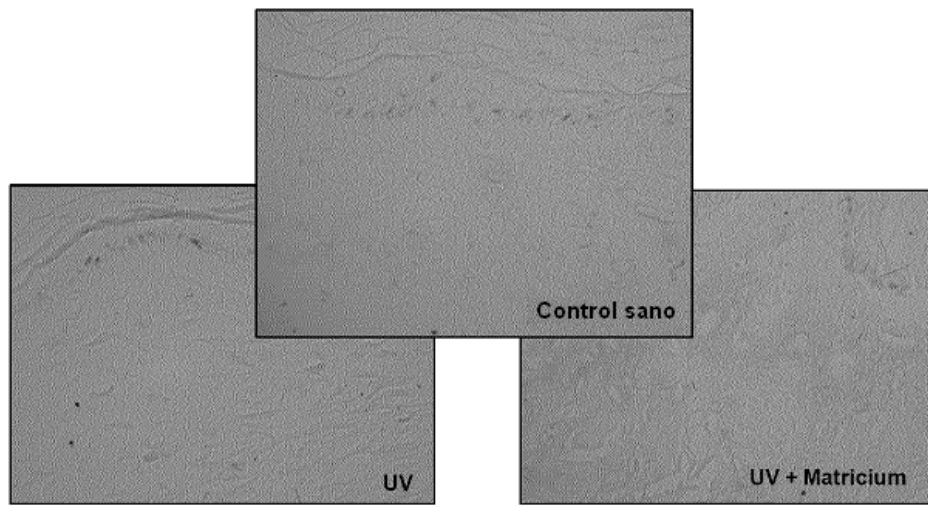


Figura 7