

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 783**

51 Int. Cl.:

A61K 8/65 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2011 PCT/KR2011/001040**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012 WO12099293**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2011 E 11856000 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2666462**

54 Título: **Gel de colágeno reticulado por radiación, método de preparación del mismo**

30 Prioridad:

19.01.2011 KR 20110005588

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

22.05.2018

73 Titular/es:

**SEWON CELLONTECH CO., LTD (100.0%)
4,6th Floor, HP Building 23-6 Yeouido-dong
Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-724, KR**

72 Inventor/es:

**YU, JI CHUL;
YEO, SE KEN;
KIM, TAI HYOUNG;
SHU, DONG SAM y
CHANG, CHEONG HO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 668 783 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 colágeno reticulado por radiación, método de preparación del mismo

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a un gel de colágeno reticulado por radiación y al método de preparación y uso del mismo, y más en particular a un método de preparación que puede preparar un gel de colágeno formulado usando un método de reticulación física en lugar de un método de reticulación química. En la presente divulgación, se formula el colágeno con un material biocompatible y se reticula para proporcionar un hidrogel de colágeno que se puede usar para apósitos para heridas, materiales de injerto y cultivo celular. En consecuencia, la presente divulgación proporciona un método industrialmente conveniente y seguro para preparar un gel de colágeno que ha mejorado significativamente su calidad y confianza, y por tanto presenta una buena imagen para los consumidores.

15 **Técnica anterior**

Como es bien conocido, el colágeno es una proteína estructural que forma tejidos blandos tales como dermis, tendón/ligamento, vasos sanguíneos y similares, y tejidos duros tales como huesos, y representa aproximadamente 1/3 de la proteína total en los mamíferos.

Son conocidos 20 o más tipos de colágeno, y aproximadamente un 90 % del mismo es colágeno de tipo I que forma la piel, tendón/ligamento, huesos y similares.

El colágeno es una molécula tricatenaria que tiene un peso molecular de aproximadamente 300.000 dalton (100.000 dalton para cada hebra) y está compuesto de repeticiones -GXY-, en las que G es glicina (el aminoácido más pequeño), y X e Y son aminoácidos distintos de glicina.

El colágeno se usa actualmente en aplicaciones médicas, incluyendo agentes hemostáticos, apósitos para heridas, vasos sanguíneos artificiales, materiales para reducir arrugas, etc. En el caso de agentes hemostáticos, Avitene, que es un colágeno en polvo extraído de piel de ternera, se desarrolló por primera vez en 1974 y se ha usado hasta la fecha.

El colágeno tiene varias ventajas, incluyendo baja antigenicidad, alta biocompatibilidad y bioabsorbabilidad, inducción de adhesión celular, crecimiento y diferenciación, coagulación sanguínea, efectos hemostáticos y compatibilidad con otros polímeros.

Sin embargo, los productos hechos solo de colágeno tienen propiedades físicas bajas (resistencia a la tracción, elasticidad, degradabilidad, etc.), y por tanto, son algo difíciles de usar en aplicaciones que requieren propiedades físicas. Por este motivo, se han producido productos de colágeno añadiendo otros materiales biocompatibles (polímeros sintéticos, bioproteínas, hidratos de carbono y otros compuestos) que tienen suficiente resistencia a la tracción o resistencia al desgarro.

Además, los productos de colágeno se formulan con compuestos químicos para mejorar las propiedades físicas de los mismos, pero la mayoría de los compuestos usados son nocivos para el cuerpo humano.

Los documentos de la técnica anterior relacionados con productos de colágeno incluyen el registro de patente coreana n.º 0837858 (solicitud n.º 2006-0129466; titulada "Método para preparar oligopéptidos hidrosolubles a partir de colágeno de piel porcina por irradiación con radiación").

Específicamente, el registro de patente coreana n.º 0837858 divulga un método para preparar oligopéptidos hidrosolubles a partir de colágeno de piel porcina por irradiación con radiación, comprendiendo el método las etapas de: irradiar colágeno de piel porcina con rayos γ a una dosis de 50-300 kGy, y disolver el colágeno de piel porcina irradiado en una cantidad de 5-10 veces (p/v) de solución de NaCl 0,05-0,1 M para formar un colágeno hidrosoluble; y añadir un 0,5-1 % en peso de enzima papaína al colágeno hidrosoluble, permitir que la mezcla repose durante 0,5-4 horas, y fraccionar el material tratado con enzima en oligopéptidos específicos que tienen pesos moleculares de 10.000-5.000 dalton, 5.000-3.000 dalton y 3.000-1.000 dalton, respectivamente.

La técnica anterior mencionada anteriormente se describirá ahora con más detalle.

60 **Etapa 1: Hacer que el colágeno de piel porcina sea hidrosoluble**

La etapa de hacer que el colágeno de piel porcina sea hidrosoluble comprende: un proceso de retirar materiales innecesarios (grasas e impurezas) de la piel porcina y lavar la piel porcina restante con agua; un proceso de cortar la piel porcina lavada en un tamaño adecuado y triturar la piel porcina cortada con ondas ultrasónicas; y un proceso de irradiar la piel porcina triturada con radiación a una dosis de 50-300 kGy y disolver la piel porcina irradiada en una cantidad de 5-10 veces (p/v) de solución de NaCl 0,10 M, preferentemente solución de NaCl 0,05-0,1 M. En el

presente documento, una dosis de radiación adecuada para hacer el colágeno de piel porcina es de 100 kGy o más. Un método existente requiere el uso de grandes cantidades de materiales químicos ácidos y alcalinos, mientras que la técnica anterior mencionada anteriormente puede producir materiales de bajo peso molecular hidrosolubles con un rendimiento muy alto (4 veces o más que el del método existente) sin tener que usar ácido o sal).

5

Etapa 2: Preparación de oligopéptidos específicos usando enzima

10 Se añade hidrolasa tal como papaína a la piel porcina irradiada para disociar el componente hidrosoluble. Esta etapa comprende: un proceso de añadir un 1,5-1 % en peso de papaína a la piel porcina irradiada y permitir que la mezcla repose durante 0,5-4 horas para reducir el peso molecular del componente hidrosoluble; fraccionar el componente de bajo peso molecular de acuerdo con el peso molecular usando un proceso de ultrafiltración; un proceso de liofilizar los componentes peptídicos fraccionados, preparando así oligopéptidos específicos derivados de colágeno de piel porcina.

15 Sin embargo, la técnica anterior mencionada anteriormente también tiene un problema ya que, debido a que es la tecnología de reducir en lugar de incrementar el peso molecular del colágeno, es imposible formular los oligopéptidos solos y formular los oligopéptidos con materiales biocompatibles.

20 Por tanto, la técnica anterior mencionada anteriormente también tiene un problema ya que, debido a que reduce el peso molecular del colágeno, no puede proporcionar una formulación de hidrogel que se pueda usar para apósitos para heridas, materiales de injerto y cultivo celular.

25 Como resultado, la técnica anterior mencionada anteriormente no proporciona un método de preparación que sea industrialmente aplicable, conveniente y seguro.

25

Otros documentos enseñan hidrogeles mixtos que incluyen colágeno.

30 El documento KR 100783 228 divulga un método para preparar un gel de colágeno reticulado por radiación que comprende mezclar colágeno con PVA y reticular la mezcla por irradiación con rayos gamma.

30

El documento WO 8202716 divulga hidrogeles mixtos que incluyen colágeno, que se gelifican usando rayos gamma.

35 El documento KR 10-0848712 divulga un hidrogel preparado a partir de quitosano y Pluronic F127, usando irradiación UV.

35

TRANQUILAN-ARANILLA C ET AL: "Kappa-carrageenan-polyethylene oxide hydrogel blends prepared by gamma irradiation", RADIATION PHYSICS AND CHEMISTRY, PERGAMON, AMSTERDAM, NL, vol. 55, n.º 2, 11 julio 1999, páginas 127-131 divulga combinaciones de hidrogel formadas con mezclas de kappa-carragenano y poli(óxido de etileno), gelación usando irradiación gamma.

40

Samuel Zalipsky ET AL: "Introduction to Chemistry and Biological Applications of Poly(ethylene glycol)" En: "Poly(ethylene glycol)", 5 agosto 1997 (1997-08-05), American Chemical Society, Washington, DC, analiza las aplicaciones biológicas de polietilenglicol.

45

El documento WO 9606883 divulga un implante de gel de PEO inyectable preparado usando irradiación.

50 WANG L ET AL: "Effects of nerve growth factor delivery via a collagen/nano-hydroxyapatite gel to mandibular distraction osteogenesis in a rabbit model", INTERNATIONAL JOURNAL OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY, COPENHAGEN, DK, vol. 38, n.º 5, 1 mayo 2009, páginas 557-558 analiza la administración de un factor de crecimiento nervioso a través de un gel de colágeno/nanohidroxiapatita. No se enseña ningún método de preparación.

El documento CN 1389512 divulga un hidrogel que comprende poli(alcohol vinílico) e hidroxiapatita.

55 **Descripción detallada de la divulgación**

Problema técnico

60 La presente divulgación se ha hecho para resolver los problemas descritos anteriormente que se producen en la técnica anterior, y es un primer objetivo de la presente divulgación preparar un colágeno reticulado irradiando colágeno líquido con radiación. Un segundo objetivo de la presente divulgación es preparar un gel de colágeno formulado usando un método de reticulación física en lugar de un método de reticulación química. Un tercer objetivo de la presente divulgación es proporcionar el uso de un hidrogel de colágeno reticulado, formulado con un material biocompatible, para apósitos para heridas, materiales de injerto y cultivo celular. Un cuarto objetivo de la presente divulgación es proporcionar un método de preparación industrialmente conveniente y seguro. Un quinto objetivo de la presente divulgación es proporcionar un gel de colágeno reticulado, que ha mejorado significativamente su calidad

65

y confianza, y por tanto puede presentar una buena imagen para los consumidores, y el método de preparación y uso del mismo.

Solución técnica

5 Para lograr los objetivos anteriores, la presente divulgación proporciona un método para preparar un gel de colágeno reticulado, comprendiendo el método irradiar colágeno líquido con radiación para preparar un colágeno reticulado, de acuerdo con la reivindicación 1.

10 La presente divulgación también proporciona un método de preparación de un material reticulado mezclando un material biocompatible y colágeno líquido e irradiando la mezcla con radiación, y un método de uso del material reticulado como material de reparación tisular para cicatrización, un injerto cutáneo, un injerto óseo o similar.

15 La presente divulgación también proporciona un método de uso de un hidrogel de la presente divulgación en una mezcla con un componente cosmético, o uso del hidrogel como mascarilla en una mezcla con un componente cosmético, o uso del hidrogel como un apósito para heridas.

20 La presente divulgación también proporciona un método de uso de un gel de colágeno reticulado por radiación, comprendiendo el método: obtener un colágeno parcialmente reticulado usando una dosis baja de radiación; verter el colágeno parcialmente reticulado junto con una solución gelificante en un molde para formar un gel; verter células y un medio en el gel; cultivar las células en el gel; y usar el material cultivado (hidrogel) en una mezcla con un componente cosmético, o usar el hidrogel como mascarilla en una mezcla con un componente cosmético, o usar el hidrogel como apósito para heridas o aplicar el hidrogel a una piel lesionada, o usar el hidrogel como material de injerto cutáneo.

25 La presente divulgación también proporciona un método de uso de un gel de colágeno reticulado por radiación, comprendiendo el método: obtener un colágeno parcialmente reticulado usando una dosis baja de radiación; mezclar el colágeno parcialmente reticulado con una solución gelificante para formar un gel; secar el gel para formar una película fina; verter células y un medio sobre la película; cultivar las células en la película; e injertar los queratocitos cultivados en un globo ocular.

30 La presente divulgación también proporciona un método de uso de un gel de colágeno reticulado por radiación, comprendiendo el método: obtener un colágeno parcialmente reticulado usando una dosis baja de radiación; mezclar el colágeno parcialmente reticulado con una solución gelificante y células; cultivar la mezcla; moler finamente el material cultivado; disponer el material molido en una jeringa; e injertar el material de la jeringa en la piel o hueso por inyección.

Efectos ventajosos

40 Como se describe anteriormente, la presente divulgación proporciona un método de preparación de un colágeno reticulado por irradiación de colágeno líquido con radiación.

45 De acuerdo con la presente divulgación, se puede preparar un gel de colágeno formulado usando un método de reticulación física en lugar de un método de reticulación química.

En particular, la presente divulgación proporciona un método de uso de un hidrogel de colágeno reticulado, formulado con un material biocompatible, para apósitos para heridas, materiales de injerto y cultivo celular.

50 Por tanto, la presente divulgación proporciona un método de preparación industrialmente conveniente y seguro.

Debido a los efectos anteriores, el gel de colágeno de acuerdo con la presente divulgación ha mejorado significativamente su calidad y confianza, y por tanto puede presentar una buena imagen para los consumidores.

Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1 es una vista esquemática que muestra colágeno reticulado usando radiación.

60 Las figuras 2 a 6 son fotografías de geles de colágeno reticulado por radiación de acuerdo con la presente divulgación.

Las figuras 7 y 8 son fotografías de un hidrogel que comprende un colágeno parcialmente reticulado de acuerdo con la presente divulgación.

65 Las figuras 9 a 11 muestran el grado de reticulación parcial de colágeno en función de la dosis de radiación en la presente divulgación.

La figura 12 es una fotografía de un hidrogel de colágeno reticulado por radiación de acuerdo con la presente divulgación.

5 La figura 13 es una fotografía de una película de colágeno reticulado por radiación de acuerdo con la presente divulgación.

Las figuras 14 a 16 son fotografías de partículas obtenidas de un hidrogel de colágeno reticulado por radiación de acuerdo con la presente divulgación.

10 Las figuras 17 a 19 muestran esquemáticamente métodos de gelificación de un colágeno reticulado por radiación para cultivo celular de acuerdo con la presente divulgación.

Modo para llevar a cabo la divulgación

15 A continuación en el presente documento, se describirán en detalle modos de realización preferentes para lograr los efectos anteriores de la presente divulgación con referencia a los dibujos adjuntos.

Las figuras 1 a 19 muestran un gel de colágeno reticulado de acuerdo con la presente divulgación y el método de preparación y uso del mismo.

20 En la siguiente descripción, se omitirá una descripción detallada de funciones y configuraciones conocidas incorporadas en el presente documento cuando pueda confundir la materia objeto de la presente divulgación.

25 Además, los términos usados en la siguiente descripción son términos definidos teniendo en cuenta las funciones obtenidas de acuerdo con la presente divulgación, y se pueden cambiar de acuerdo con la opción de un fabricante o una práctica habitual. En consecuencia, las definiciones de estos términos se deben basar en la descripción global en el presente documento.

30 La tecnología de la formulación usando radiación se puede explicar por reticulación de radicales libres, y los métodos para la reticulación por radiación incluyen la irradiación con rayos gamma, irradiación con rayos de electrones, irradiación con rayos X y similares.

35 Los rayos gamma son rayos de longitud de onda corta del isótopo radioactivo cobalto 60 y tienen alta penetrabilidad. Los rayos gamma se usan en diversas aplicaciones, incluyendo esterilización de productos, mejora de las propiedades físicas de polímeros y coloración de joyas.

40 Los rayos de electrones son ondas electromagnéticas que tienen una alta energía cinética, que se obtienen aplicando un alto voltaje a electrones térmicos producidos a partir de wolframio calentado eléctricamente a alta temperatura. Los rayos de electrones son energía de ionización, como los rayos gamma o rayos X, y se pueden usar en diversos campos industriales, y la dosis de los mismos se puede controlar dependiendo del uso previsto.

La irradiación con radiación se puede realizar en ausencia de sustancias químicas sin verse influida sustancialmente por la temperatura, humedad o presión. Además, se usa simplemente para la esterilización y también es rentable.

45 El método para reticular por radiación elimina la necesidad de retirar agentes de reticulación tóxicos residuales y puede provocar reacciones químicas incluso en un estado sólido o a baja temperatura, a diferencia de los métodos de reticulación química que usan formaldehído y similares. Además, puede controlar fácilmente las propiedades físicas de un material usando una dosis controlada de radiación sin cambiar la composición del material. Por tanto, se han estudiado y desarrollado métodos para procesar polímeros usando radiación en diversos campos, incluyendo hidrogel para cicatrización y tratamiento de quemaduras, biomateriales y similares.

50 De acuerdo con la teoría general de la química de la radiación, se reticula una solución de colágeno en un disolvente hidrosoluble por radicales hidroxilo (OH) producidos por irradiación con radiación, y se puede reticular colágeno por radiación.

55 Se produce reticulación por polimerización de radicales. La polimerización de radicales, que es una reacción en cadena, avanza en general en el orden de iniciación, propagación o crecimiento, terminación y movimiento. Se usa un iniciador de la polimerización de radicales para producir radicales, y se usa un compuesto tal como peróxido o un compuesto azoico, que se controla fácilmente, como iniciador. Además del compuesto iniciador, también se usa energía tal como calor, luz o radiación, para producir radicales, y se puede realizar la reticulación sin el uso de un compuesto químico. Cuando se irradia radiación, se producen radicales libres por el suministro de energía a una molécula de agua o un material. Los radicales libres influyen en la reticulación del material. El grado de reticulación depende de la dosis de radiación, y cuando se consumen los radicales libres producidos, se termina la reticulación. Por tanto, se puede controlar el grado de reticulación de un material controlando la dosis de radiación.

65 Un material tratado con radiación existe como solución polimérica o hidrogel, dependiendo del grado de reticulación.

- El colágeno tiene las propiedades de un polímero de transición de fases. Como se usa en el presente documento, el término "polímero de transición de fases" se refiere a un polímero con propiedades físicas que cambian en respuesta a estímulos externos tales como temperatura, pH, campos eléctricos y luz. Un polímero con propiedades físicas que cambian en respuesta a la temperatura se denomina polímero sensible a la temperatura. En particular, el colágeno tiene las propiedades del polímero sensible a la temperatura. El colágeno existe en una fase líquida a baja temperatura y cambia a una fase de gel opaca cuando alcanza una temperatura crítica baja.
- Específicamente, a una temperatura menor que la temperatura de solución crítica inferior (LCST), el colágeno se disuelve debido a un enlace de hidrógeno con agua, y el enlace de hidrógeno se rompe con el incremento de la temperatura de modo que las unidades de polímero se aglomeran entre sí para formar un gel o precipitado. Cuando se forma el gel, el enlace es un enlace físico que no es un enlace fuerte tal como un enlace covalente, sino que es atribuible a una fuerza intermolecular tal como un enlace hidrófobo o un enlace polar. En general, en el caso de polímeros neutralizados, el gel se produce por interacción hidrófoba.
- Una solución de colágeno parcialmente reticulada por radiación también tiene las propiedades de un polímero sensible a la temperatura. En particular, cuando la solución de colágeno parcialmente reticulado se polimeriza para formar un gel, muestra una formulación transparente/semitransparente y una elasticidad relativamente alta.
- La solución de colágeno parcialmente reticulado se puede usar como herramienta para cultivo celular. Cuando se gelifica una formulación que comprende colágeno puro general, muestra una formulación opaca y de baja elasticidad. Además, el uso de la solución de colágeno parcialmente reticulado puede acortar ventajosamente el tiempo de gelificación.
- La solución de colágeno parcialmente reticulado se puede usar en el campo de la ingeniería tisular, el campo cosmético y similares. En particular, se puede usar como estructura para cultivo celular en el campo de la ingeniería tisular. Específicamente, se puede usar en un método de cultivo de células usando un gel de colágeno producido, un método de cultivo de células usando una película de colágeno producida, y un método de cultivo de células usando un gel formado después de mezclar el colágeno reticulado con células. En particular, las células cultivadas pueden usarse en diversas aplicaciones dependiendo de las características y formulaciones de las células.
- Un hidrogel de colágeno obtenido por irradiación con radiación está en forma de colágeno cristalizado. Es biocompatible y flexible y se puede formular para tener las propiedades físicas requeridas. Por tanto, se usa como biotejido en diversos campos, incluyendo los campos de apósitos para heridas, medicina cosmética y regenerativa. Un gel formado por reticulación física no tiene ningún agente de reticulación químico nocivo para el cuerpo humano, y por tanto está recibiendo atención como material médico. Los productos producidos por este método tienen las ventajas de que se producen fácilmente, son inocuos para los seres humanos y los entornos, y se pueden formular de varias formas.
- Por tanto, este polímero es un buen material que se puede usar como material de administración de fármaco, un material de administración de células o una matriz extracelular inyectable en el campo de la ingeniería tisular.
- La tecnología basada en la radiación también permite el desarrollo de dispositivos médicos. Cuando se estudian y se desarrollan operaciones para las que se aplican materiales a base de colágeno y dispositivos a base de radiación (por ejemplo, dispositivos de rayos X o bisturís de rayos gamma), darán lugar a un desarrollo significativo de la ingeniería tisular.
- El gel de colágeno reticulado por radiación se describirá ahora con más detalle.
- Como se muestra en la figura 1, la presente divulgación se caracteriza por que se prepara un colágeno reticulado irradiando colágeno líquido con radiación.
- La radiación que se usa en la presente divulgación puede ser una cualquiera seleccionada de rayos gamma, rayos de electrones y rayos X.
- La concentración de colágeno que se usa en la presente divulgación es preferentemente de un 0,1-10 % (p/v), y la dosis (tasa de dosis x tiempo) de la radiación es preferentemente de 0,1-40 kGy.
- Si la concentración de colágeno es menor de un 0,1 %, el grado de reticulación de colágeno será bajo de modo que el colágeno parcialmente reticulado no se puede gelificar, y si la concentración de colágeno es mayor de un 10 %, será difícil para la tecnología actual mezclar el colágeno para tener una distribución de concentraciones uniforme. Por este motivo, la concentración de colágeno es preferentemente de un 0,1-10 % (p/v).
- Si la dosis de la radiación es menor de 0,1 kGy, el grado de reticulación de colágeno será bajo de modo que el colágeno parcialmente reticulado no se puede gelificar, y si la dosis de radiación es mayor de 40 kGy, el colágeno se descompondrá en lugar de estar parcialmente reticulado. Por este motivo, la dosis de radiación es preferentemente

de 0,1-40 kGy.

Mientras tanto, un método para preparar el gel de colágeno reticulado por radiación de acuerdo con la presente divulgación es como sigue.

5 Específicamente, se puede preparar el gel de colágeno reticulado por radiación mezclando un 3 % (p/v) de colágeno con cada uno de un 3 % (p/v) de polímero sintético Pluronic F-127, un 1 % (p/v) de PEO (poli(óxido de etileno) (MW = 100.000) y un 3 % (p/v) de hidroxiapatita y reticulando la mezcla por irradiación con rayos gamma.

10 Otro método para preparar el gel de colágeno reticulado por radiación de acuerdo con la presente divulgación es como sigue.

15 Específicamente, se puede preparar el gel de colágeno reticulado por radiación mezclando un 3 % (p/v) de colágeno con cada uno de un 3 % (p/v) de biopolímero ácido hialurónico (MW = 2.000 K) y 3 % (p/v) de sulfato de condroitina y reticulando la mezcla por irradiación con rayos gamma.

Todavía otro método para preparar el gel de colágeno reticulado por radiación de acuerdo con la presente divulgación es como sigue.

20 Específicamente, se puede preparar gel de colágeno reticulado por radiación mezclando un 3 % (p/v) de colágeno con cada uno de un 3 % (p/v) de silicona (Dow Corning, 7-9800), un 6 % (p/v) de glicerol y un 6 % (p/v) de PBS y reticulando la mezcla por irradiación con rayos gamma, en el que el componente de PBS incluye 2,8 mg de fosfato de sodio y 7,6 mg de cloruro de sodio por ml del volumen final.

25 De acuerdo con los métodos anteriores de la presente divulgación, se pueden obtener los geles de colágeno reticulado por radiación mostrados en las figuras 2 a 6.

Las configuraciones descritas anteriormente de la presente divulgación se pueden modificar de diversas formas.

30 Se debe entender que la presente divulgación no se limita a las formas específicas mencionadas en la descripción detallada anteriormente e incluye todas las modificaciones, equivalentes y sustituciones dentro del espíritu y alcance de la presente divulgación como se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 Los efectos del gel de colágeno reticulado por radiación de acuerdo con la presente divulgación y el método de preparación y uso del mismo son los siguientes.

40 De acuerdo con la presente divulgación, se puede preparar un gel de colágeno formulado usando un método de reticulación física en lugar de un método de reticulación química. En particular, se puede usar un gel de colágeno reticulado formulado con un material biocompatible para apósitos para heridas, materiales de injerto y cultivo celular. Por tanto, la presente divulgación proporciona un método industrialmente conveniente y seguro para preparar el gel de colágeno reticulado.

Ejemplo 1 (no de acuerdo con la reivindicación)

45 **A. Análisis del grado de reticulación de colágeno al 3-10 % en función de la dosis de radiación (5-40 kGy)**

Propósito: analizar las propiedades físicas en función de la concentración de colágeno y la dosis de rayos gamma

50 Método

1) Se preparan colágenos cada uno al 3 %, 6 % y 10 % en un recipiente.

55 2) Se irradian los colágenos con rayos gamma a dosis de 5, 25 y 40 kGy, respectivamente.

3) Se analizan las propiedades físicas de los colágenos reticulados en las condiciones anteriores.

A) Se observan visualmente los aspectos (transparencia y tendencia gelificante).

60 B) Se examina la tasa de contracción (porcentaje de disminución en volumen) del hidrogel.

C) Se mide la resistencia del gel (tensión máxima) usando un instrumento de medición.

- Instrumento: Reómetro (CR-500DX).

65 - Condiciones: unidad de medición (resistencia del gel), distancia de penetración (2,5 mm), velocidad de la mesa (50

mm/min) y adaptador (n.º 1 Φ15 mm).

D) Se determina la degradabilidad como el número de días durante los que permanece el gel en presencia de colagenasa.

5 - Concentración de colagenasa: 0,1 mg/ml en PBS

E) Se analiza el contenido de agua (cambio en el contenido de agua) del colágeno reticulado comparando el peso después de la liofilización con el peso después de la hidratación del colágeno reticulado.

10 Resultados

1) Aspecto: gel transparente (que tiene amarillo débil a 40 kGy)

15 2) Tasa de contracción (porcentaje de disminución en volumen) = (peso total (g) de la muestra irradiada con rayos gamma) - peso (g) de la masa de gel / peso total (g) de la muestra irradiada con rayos gamma X 100

Tabla 1

| Tasa de contracción (%) | Dosis de rayos gamma (kGy) | | |
|-------------------------|----------------------------|-----|------|
| Concentración (%) | 5 | 25 | 40 |
| 3 | 0,0 | 2,8 | 18,0 |
| 6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 10 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

20 3) Resistencia del gel (tensión máxima)

Tabla 2

| Resistencia del gel (N) | Dosis de rayos gamma (kGy) | | |
|-------------------------|----------------------------|------|------|
| Concentración (%) | 5 | 25 | 40 |
| 3 | 23,9 | 40,9 | 35,0 |
| 6 | 6,9 | 45,2 | 39,7 |
| 10 | 9,8 | 58,6 | 79,6 |

4) Degradabilidad (días)

25

Tabla 3

| Degradabilidad | Dosis de rayos gamma (kGy) | | |
|-------------------|----------------------------|------|------|
| Concentración (%) | 5 | 25 | 40 |
| 3 | ** | ** | * |
| 6 | *** | *** | *** |
| 10 | *** | **** | **** |

Degradabilidad (días) - * 1 día o menos, ** 2 días o menos, *** 7 días o menos, y **** más de 7 días

30 5) Contenido de agua (cambio en el contenido de agua) = (peso (g) de gel de colágeno hidratado - peso (g) de gel de colágeno reticulado liofilizado) / peso (g) de gel de colágeno reticulado liofilizado

Tabla 4

| Contenido de agua (cambio en el contenido de agua, veces) | Dosis de rayos gamma (kGy) | | |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------|------|------|
| Concentración (%) | 5 | 25 | 40 |
| 3 | 36,9 | 26,3 | 26,7 |
| 6 | 20,2 | 8,3 | 21,1 |
| 10 | 18,8 | 9,1 | 8,8 |

Ejemplo 2 (no de acuerdo con la reivindicación)

B. Análisis del grado de reticulación de gelatina al 3-10 % en función de la dosis de radiación (5-40 kGy)

5 Propósito: analizar las propiedades físicas en función de la concentración de gelatina y la dosis de rayos gamma

Método

- 1) Se preparan gelatinas cada una al 3 %, 6 % y 10 % en un recipiente.
- 10 2) Se irradian las gelatinas con rayos gamma a dosis de 5, 25 y 40 kGy, respectivamente.
- 3) Se analizan las propiedades físicas de los colágenos reticulados en las condiciones anteriores.
- 15 A) Se observan visualmente los aspectos (transparencia y tendencia gelificante).
- B) Se examina la tasa de contracción (porcentaje de disminución en volumen) del hidrogel.
- C) Se mide la resistencia del gel (tensión máxima) usando un instrumento de medición.
- 20 - Instrumento: Reómetro (CR-500DX).
- Condiciones: unidad de medición (resistencia del gel), distancia de penetración (2,5 mm), velocidad de la mesa (50 mm/min) y adaptador (n.º 1 Φ15 mm).
- 25 D) Se determina la degradabilidad como el número de días durante los que permanece la gelatina en presencia de colagenasa.
- Concentración de colagenasa: 0,1 mg/ml en PBS
- 30 E) Se analiza el contenido de agua (cambio en el contenido de agua) del colágeno reticulado comparando el peso después de la liofilización con el peso después de la hidratación del colágeno reticulado.

Resultados

- 35 1) Aspecto (transparencia)

Tabla 5

| Aspecto | Dosis de rayos gamma (kGy) | | |
|-------------------|----------------------------|------|------|
| Concentración (%) | 5 | 25 | 40 |
| 3 | ** | * | * |
| 6 | *** | *** | *** |
| 10 | **** | **** | **** |

40 Aspecto (transparencia) - * opaco, ** semitransparente, *** transparente, **** transparente (amarillento)

2) Tasa de contracción (porcentaje de disminución en volumen) = (peso total (g) de la muestra irradiada con rayos gamma) - peso (g) de la masa de gel / peso total (g) de la muestra irradiada con rayos gamma X 100

45 Tabla 6

| Tasa de contracción (%) | Dosis de rayos gamma (kGy) | | |
|-------------------------|----------------------------|------|------|
| Concentración (%) | 5 | 25 | 40 |
| 3 | 4,8 | 31,0 | 35,1 |
| 6 | 2,1 | 22,1 | 32,5 |
| 10 | 0,0 | 9,9 | 15,6 |

3) Resistencia del gel (tensión máxima)

Tabla 7

| Resistencia del gel (N) | Dosis de rayos gamma (kGy) | | |
|-------------------------|----------------------------|-----|-----|
| Concentración (%) | 5 | 25 | 40 |
| 3 | 4,5 | 2,9 | 2,6 |
| 6 | 4,9 | 9,6 | 7,1 |
| 10 | 3,2 | 4,8 | 8,6 |

4) Degradabilidad (días)

Tabla 8

| Degradabilidad | Dosis de rayos gamma (kGy) | | |
|-------------------|----------------------------|----|----|
| Concentración (%) | 5 | 25 | 40 |
| 3 | * | * | * |
| 6 | * | * | * |
| 10 | * | * | * |

5

Degradabilidad (días) - * 1 día o menos, ** 2 días o menos, *** 7 días o menos, y **** más de 7 días

5) Contenido de agua (cambio en el contenido de agua) = (peso (g) de gel de colágeno hidratado - peso (g) de gel de colágeno reticulado liofilizado) / peso (g) de gel de colágeno reticulado liofilizado

10

Tabla 9

| Contenido de agua (cambio en el contenido de agua, veces) | Dosis de rayos gamma (kGy) | | |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------|------|------|
| Concentración (%) | 5 | 25 | 40 |
| 3 | 33,1 | 25,7 | 26,2 |
| 6 | 25,9 | 11,7 | 15,1 |
| 10 | 13,1 | 9,8 | 9,3 |

Ejemplo 3

15 **C. Material preparado irradiando una mezcla de colágeno y un polímero sintético con radiación**

Propósito: examinar si se puede formular una mezcla de colágeno y un polímero sintético.

Método

20

1) Se mezcla colágeno al 3 % (p/v) con cada uno de Pluronic F-127 al 3 % en peso (p/v), PEO (poli(óxido de etileno) (MW = 100.000) al 1 % (p/v) e hidroxiapatita al 3 % (p/v), y a continuación se reticula por rayos gamma (5 y 25 kGy).

2) Se analizan las propiedades físicas de la mezcla reticulada.

25

A) Se observan visualmente los aspectos (transparencia y tendencia gelificante).

B) Se examina la tasa de contracción (porcentaje de disminución en volumen) de la mezcla.

30

C) Se mide la resistencia del gel (tensión máxima) usando un instrumento de medición.

- Instrumento: Reómetro (CR-500DX).

35

- Condiciones: unidad de medición (resistencia del gel), distancia de penetración (2,5 mm), velocidad de la mesa (50 mm/min) y adaptador (n.º 1 Φ15 mm).

D) Se determina la degradabilidad como el número de días durante los que permanece la mezcla reticulada en presencia de colagenasa.

40

- Concentración de colagenasa: 0,1 mg/ml en PBS

E) Se analiza el contenido de agua (cambio en el contenido de agua) de la mezcla reticulada comparando el peso

después de la liofilización con el peso después de la hidratación de la mezcla reticulada.

Resultados

5 1) Aspecto (transparencia)

Tabla 10

| Aspecto | Polímero sintético mezclado con colágeno | | |
|---------|------------------------------------------|----------------|-----------------|
| | Dosis de rayos gamma (kGy) | Hidroxiapatita | PEO (MW = 100K) |
| 5 | ** (distribución de HAP) | ** | ** |
| 25 | - | ** | ** |

Aspecto (transparencia) - * opaco, ** semitransparente, *** transparente, **** transparente (amarillento)

10

2) Tasa de contracción (porcentaje de disminución en volumen) = (peso total (g) de la muestra irradiada con rayos gamma) - peso (g) de la masa de gel / peso total (g) de la muestra irradiada con rayos gamma X 100

Tabla 11

| Tasa de contracción (porcentaje de disminución en volumen) | Polímero sintético mezclado con colágeno | | |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------|-----------------|
| | Dosis de rayos gamma (kGy) | Hidroxiapatita | PEO (MW = 100K) |
| 5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 25 | - | 2,1 | 0,0 |

15

3) Resistencia del gel (tensión máxima)

Tabla 12

| Resistencia del gel (tensión máxima) (N) | Polímero sintético mezclado con colágeno | | |
|------------------------------------------|------------------------------------------|----------------|-----------------|
| | Dosis de rayos gamma (kGy) | Hidroxiapatita | PEO (MW = 100K) |
| 5 | 11,3 | 40,3 | 3,9 |
| 25 | - | 57,3 | 16,0 |

20 4) Degradabilidad (días)

Tabla 13

| Degradabilidad (días) | Polímero sintético mezclado con colágeno | | |
|-----------------------|------------------------------------------|----------------|-----------------|
| | Dosis de rayos gamma (kGy) | Hidroxiapatita | PEO (MW = 100K) |
| 5 | ** | * | * |
| 25 | - | * | * |

Degradabilidad (días) - * 1 día o menos, ** 2 días o menos, *** 7 días o menos, y **** más de 7 días

25

5) Contenido de agua (cambio en el contenido de agua) = (peso (g) de gel de colágeno hidratado - peso (g) de gel de colágeno reticulado liofilizado) / peso (g) de gel de colágeno reticulado liofilizado

Tabla 14

| Contenido de agua (cambio en el contenido de agua, veces) | Polímero sintético mezclado con colágeno | | |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------|-----------------|
| | Dosis de rayos gamma (kGy) | Hidroxiapatita | PEO (MW = 100K) |
| 5 | 13,6 | 22,8 | 45,6 |
| 25 | - | 22,4 | 27,0 |

30

Ejemplo 4 (no de acuerdo con la reivindicación)

D. Material preparado irradiando una mezcla de colágeno y un biopolímero con radiación

Propósito: examinar si se puede formular una mezcla de colágeno y un biopolímero.

Método

- 5 1) Se mezcla colágeno al 3 % con cada uno de ácido hialurónico (MW = 2.000 K) al 3 % y sulfato de condroitina al 3 % y a continuación se reticula por rayos gamma (5 y 25 kGy).
- 2) Se analizan las propiedades físicas de la mezcla reticulada.
- 10 A) Se observan visualmente los aspectos (transparencia y tendencia gelificante).
- B) Se examina la tasa de contracción (porcentaje de disminución en volumen) del hidrogel.
- C) Se mide la resistencia del gel (tensión máxima) usando un instrumento de medición.
- 15 - Instrumento: Reómetro (CR-500DX).
- Condiciones: unidad de medición (resistencia del gel), distancia de penetración (2,5 mm), velocidad de la mesa (50 mm/min) y adaptador (n.º 1 Φ15 mm).
- 20 D) Se determina la degradabilidad como el número de días durante los que permanece la mezcla reticulada en presencia de colagenasa.
- Concentración de colagenasa: 0,1 mg/ml en PBS
- 25 E) Se analiza el contenido de agua (cambio en el contenido de agua) de la mezcla reticulada comparando el peso después de la liofilización con el peso después de la hidratación de la mezcla reticulada.

Resultados

- 30 1) Aspecto (transparencia)

Tabla 15

| Aspecto | Biopolímero mezclado con colágeno | |
|----------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| | Ácido hialurónico | Sulfato de condroitina |
| Dosis de rayos gamma (kGy) | | |
| 5 | ** | * |
| 25 | ** | * |

- 35 Aspecto - * opaco, ** semitransparente, *** transparente, **** transparente (amarillento)

2) Tasa de contracción (porcentaje de disminución en volumen) = (peso total (g) de la muestra irradiada con rayos gamma) - peso (g) de la masa de gel / peso total (g) de la muestra irradiada con rayos gamma X 100

40 Tabla 16

| Tasa de contracción (porcentaje de disminución en volumen) | Biopolímero mezclado con colágeno | |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| | Ácido hialurónico | Sulfato de condroitina |
| Dosis de rayos gamma (kGy) | | |
| 5 | 0,0 | 0,0 |
| 25 | 0,0 | 0,0 |

- 3) Resistencia del gel (tensión máxima)

Tabla 17

| Resistencia del gel (tensión máxima) (N) | Biopolímero mezclado con colágeno | |
|------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| | Ácido hialurónico | Sulfato de condroitina |
| Dosis de rayos gamma (kGy) | | |
| 5 | 2,5 | 0,9 |
| 25 | 13,5 | 20,8 |

- 45 4) Degradabilidad (días)

Tabla 18

| Degradabilidad (días) | Biopolímero mezclado con colágeno | |
|----------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| | Ácido hialurónico | Sulfato de condroitina |
| Dosis de rayos gamma (kGy) | | |
| 5 | ** | ** |
| 25 | ** | * |

Degradabilidad (días) - * 1 día o menos, ** 2 días o menos, *** 7 días o menos, y **** más de 7 días

- 5) Contenido de agua (cambio en el contenido de agua) = (peso (g) de gel de colágeno hidratado - peso (g) de gel de colágeno reticulado liofilizado) / peso (g) de gel de colágeno reticulado liofilizado

Tabla 19

| Contenido de agua (cambio en el contenido de agua, veces) | Biopolímero mezclado con colágeno | |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| | Ácido hialurónico | Sulfato de condroitina |
| Dosis de rayos gamma (kGy) | | |
| 5 | 33,3 | 39,0 |
| 25 | 23,6 | 20,5 |

Ejemplo 5 (no de acuerdo con la reivindicación)

E. Material preparado irradiando una mezcla de colágeno y un compuesto químico con radiación

Propósito: examinar si se puede formular una mezcla de colágeno y un compuesto químico.

Método

1) Se mezcla colágeno al 3 % con cada uno de 1X silicona al 3 % (Dow Corning, 7-9800), glicerol al 3 % y PBS al 6 % y a continuación se reticulan por rayos gamma (5 kGy). El componente de PBS incluye 2,8 mg de fosfato de sodio y 7,6 mg de cloruro de sodio por ml del volumen final.

2) Se analizan las propiedades físicas de la mezcla reticulada.

A) Se observan visualmente los aspectos (transparencia y tendencia gelificante).

B) Se examina la tasa de contracción (porcentaje de disminución en volumen) del hidrogel.

C) Se mide la resistencia del gel (tensión máxima) usando un instrumento de medición.

- Instrumento: Reómetro (CR-500DX).

- Condiciones: unidad de medición (resistencia del gel), distancia de penetración (2,5 mm), velocidad de la mesa (50 mm/min) y adaptador (n.º 1 Φ15 mm).

D) Se determina la degradabilidad como el número de días durante los que permanece la mezcla reticulada en presencia de colagenasa.

- Concentración de colagenasa: 0,1 mg/ml en PBS

E) Se analiza el contenido de agua (cambio en el contenido de agua) de la mezcla reticulada comparando el peso después de la liofilización con el peso después de la hidratación de la mezcla reticulada.

Resultados

1) Aspecto (transparencia)

Tabla 20

| Aspecto | Compuesto químico mezclado con colágeno | | |
|------------------------------|-----------------------------------------|----------|-----|
| | Silicona | Glicerol | PBS |
| Dosis de rayos gamma (5 kGy) | * | *** | * |

Aspecto (transparencia) - * opaco, ** semitransparente, *** transparente, **** transparente (amarillento)

5 2) Tasa de contracción (porcentaje de disminución en volumen) = (peso total (g) de la muestra irradiada con rayos gamma) - peso (g) de la masa de gel / peso total (g) de la muestra irradiada con rayos gamma X 100

Tabla 21

| Contracción (porcentaje de disminución en volumen) | Compuesto químico mezclado con colágeno | | |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------|-----|
| | Silicona | Glicerol | PBS |
| Dosis de rayos gamma (5 kGy) | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

3) Resistencia del gel (tensión máxima)

10

Tabla 22

| Resistencia del gel (tensión máxima) | Compuesto químico mezclado con colágeno | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------------|----------|------|
| | Silicona | Glicerol | PBS |
| Dosis de rayos gamma (5 kGy) | - | 2,1 | 11,5 |

4) Degradabilidad (días)

15

Tabla 23

| Resistencia del gel (tensión máxima) | Compuesto químico mezclado con colágeno | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------------|----------|-----|
| | Silicona | Glicerol | PBS |
| Dosis de rayos gamma (5 kGy) | **** | ** | *** |

Degradabilidad (días) - * 1 día o menos, ** 2 días o menos, *** 7 días o menos, y **** más de 7 días

20 5) Contenido de agua (cambio en el contenido de agua) = (peso (g) de gel de colágeno hidratado - peso (g) de gel de colágeno reticulado liofilizado) / peso (g) de gel de colágeno reticulado liofilizado

Tabla 24

| Contenido de agua (cambio en el contenido de agua, veces) | Compuesto químico mezclado con colágeno | | |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------|------|
| | Silicona | Glicerol | PBS |
| Dosis de rayos gamma (5 kGy) | 11,4 | 55,9 | 13,9 |

Ejemplo 6 (no de acuerdo con la reivindicación)

25

F. Reticulación de colágeno por rayos de electrones

Propósito: inducir la reticulación parcial de colágeno por una dosis baja de radiación. Se mezcla el colágeno parcialmente reticulado con una solución gelificante y se examina si la mezcla se gelifica en función de la concentración de colágeno y la dosis de radiación (figuras 9 a 11).

30

Método

1) Se preparan soluciones de colágeno al 0,5 y al 1,0 % (pH 3,0).

35

2) Se irradia el colágeno al 1,0 % con rayos de electrones a dosis de 0,1, 0,5 y 1,0 kGy.

3) Se irradia el colágeno al 0,5% con rayos de electrones a dosis de 0,5, 1,0 y 3,0 kGy.

40

4) Se comparan los aspectos de las muestras irradiadas con rayos de electrones.

5) Se mezcla la solución parcialmente reticulada con una solución gelificante y se observa si la mezcla se gelifica.

Solución gelificante: 2,2 g de NaHCO₃ en 100 ml de NaOH 0,05 N y HEPES 200 mM.

45

A) Se examina visualmente el aspecto del gel y por un espectrofotómetro (410 nm).

C) Se mide la resistencia del gel (tensión máxima) con un instrumento de medición.

Tabla 25

| Aspecto de la solución | Dosis de rayos de electrones (kGy) | | | |
|------------------------|------------------------------------|-----|-----|------|
| Concentración (%) | 0,1 | 0,5 | 1,0 | 3,0 |
| 1,0 | * | * | ** | - |
| 0,5 | - | * | *** | **** |

5 Aspecto de la solución- * solución transparente, ** solución transparente (incremento de la viscosidad), *** masa parcial y **** masa completa

1) Aspecto del gel (observación visual)

10

Tabla 26

| Aspecto del gel | Dosis de rayos de electrones (kGy) | | | | |
|-------------------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Concentración (%) | 0,0 | 0,1 | 0,5 | 1,0 | 3,0 |
| 1,0 | *** | *** | *** | * | * |
| 0,5 | *** | * | ** | * | * |

Aspecto del gel: no gelificado, ** gel semitransparente y *** gel opaco.

15 2) Aspecto del gel (espectrofotómetro, 410 nm)

Tabla 27

| Aspecto del gel | Dosis de rayos de electrones (kGy) | | |
|-------------------|------------------------------------|------|------|
| Concentración (%) | 0,0 | 0,1 | 0,5 |
| 1,0 | 2,34 | 2,22 | 1,72 |
| 0,5 | 1,70 | - | 0,92 |

3) Resistencia del gel (tensión máxima)

20

| Resistencia del gel (tensión máxima, N) | Dosis de rayos de electrones (kGy) | | |
|-----------------------------------------|------------------------------------|------|------|
| Concentración (%) | 0,0 | 0,1 | 0,5 |
| 1,0 | 0,01 | 0,06 | 0,11 |
| 0,5 | 0,00 | - | 0,25 |

Ejemplo 7 (no de acuerdo con la reivindicación)

G. Examen de la reticulación parcial de colágeno por rayos de electrones

25

Propósito: examinar si se polimeriza colágeno por irradiación con rayos de electrones.

Método

30 1) Se irradia el colágeno al 1,0 % con rayos de electrones a dosis de 0,1 y 0,5 kGy.

2) Se analiza cada una de las muestras por HPLC en las siguientes condiciones.

A) Instrumento: Sistema de HPLC de Waters

35

B) Columna: Ultrahydrogel 250, 1000

C) Concentración de muestra: 0,1 % (1 mg/ml)

40 D) Volumen de inyección: 50 ul

E) Caudal: 1 ml/min

F) Tiempo de análisis: 15 min

5

Ejemplo 8 (no de acuerdo con la reivindicación)

H. Hidrogel y recuperación de colágeno reticulado por radiación y usabilidad de colágeno reticulado por radiación para apósitos para heridas, productos cosméticos (mascarillas) y similares.

10

Propósito: examinar si el colágeno reticulado por radiación puede formar hidrogel y puede formar una película cuando se seca. Además, examinar si la formulación de película contiene agua y se recupera. Este experimento es un experimento básico para aplicar colágeno reticulado por radiación en forma de hidrogel.

15 Método

1) Se preparan colágenos al 3 % y al 6 % en placas.

2) Se irradia cada uno de los colágenos con rayos gamma a dosis de 5 y 25 kGy.

20

3) Se secan los hidrogeles de colágeno a temperatura ambiente.

4) Se mide la elasticidad de la película, y a continuación se añade la película a agua destilada para formar hidrogel, y se mide la tasa de recuperación del contenido de agua del mismo.

25

Resultados

Tabla 29

| | | Elasticidad de la formulación de película | Tasa de recuperación del contenido de agua (%) |
|-----|--------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 3 % | 5 kGy | *** | 80 |
| | 25 kGy | *** | 30 |
| 6 % | 5 kGy | ** | 100 |
| | 25 kGy | * | 40 |

30 Elasticidad de la formulación de película - * rota, ** dura y *** doblada

$$\text{Tasa de recuperación del contenido de agua (\%)} = \frac{\text{espesor (mm) de hidrogel con agua absorbida}}{\text{espesor (mm) de hidrogel antes del secado}}$$

Ejemplo 9 (no de acuerdo con la reivindicación)

35 **I. Uso de colágeno irradiado por radiación como material de injerto**

Propósito: examinar si se pueden usar partículas obtenidas a partir de una formulación de hidrogel reticulado por radiación como materiales de injerto.

40 Método

1) Se muele una formulación de hidrogel reticulado por radiación con un homogeneizador.

2) Se muele el hidrogel en las siguientes condiciones.

45

A) Instrumento: Homogeneizador (IKA T25 digital ultra-turrax)

B) Condiciones de molienda: rpm = 4,0-240,0, 1/min X100

50

3) Se cargan las partículas en una jeringa y a continuación se inyectan a través de la aguja de la jeringa.

Ejemplo 10 (no de acuerdo con la reivindicación)

J. Estabilidad térmica del colágeno reticulado por radiación

55

ES 2 668 783 T3

Propósito: examinar si el colágeno reticulado por radiación es térmicamente estable. Después de tratar térmicamente el colágeno, también se examina si el colágeno mantiene las propiedades de hidrogel.

Material y condiciones de prueba

- 5 1) Material: colágeno al 3 % (pH 3,0).
- 2) Condiciones de reticulación: solución de colágeno; reticulación por rayos gamma a dosis de 5 kGy, 25 kGy y 40 kGy.
- 10 3) Condiciones de tratamiento térmico: 40, 60 y 80 °C (tiempo de tratamiento térmico: 1 hora).

Método

- 15 1) Se prepara colágeno reticulado por radiación que tiene un tamaño adecuado y se mide el peso del mismo.
- 2) Se dispone el colágeno reticulado preparado en un recipiente y se calienta en un baño de agua a cada una de las temperaturas anteriores durante 1 hora.
- 20 3) Después del calentamiento, se examinan el aspecto y el peso del gel de colágeno.
- 4) Se examina el cambio de peso provocado por tratamiento térmico. Sin embargo, se determina si el colágeno no reticulado se desnaturaliza en base a la gelificación en condiciones de temperatura fría.

$$\text{Tasa residual (\%)} = 100 - \frac{\text{peso inicial} - \text{peso después de tratamiento térmico}}{\text{peso inicial}} * 100$$

- 25 5) Se examina si el gel de colágeno deformado se hidrata. Se realiza la hidratación en agua durante 1 y 24 horas.

$$\text{Tasa de recuperación del contenido de agua (\%)} = 100 - \frac{\text{peso después de la hidratación}}{\text{peso inicial del hidrogel de colágeno}} * 100$$

- 30 6) Se examina si el aspecto del gel que contiene agua se cambia a 60 °C.

Resultados

Tabla 30

| 40 °C | Aspecto después de tratamiento térmico | Tasa residual (%) | Tasa de recuperación (% , 1 h) | Tasa de recuperación (% , 24 h) | Comentarios |
|--------|----------------------------------------|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 0 kGy | Viscosidad disminuida | - | - | - | Colágeno desnaturalizado |
| 5 kGy | Gel contraído transparente | 64,5 | 128,5 | 142,3 | |
| 25 kGy | Gel contraído transparente | 70,1 | 97,2 | 107,9 | |
| 40 kGy | Gel contraído transparente | 73,2 | 91,3 | 104,3 | |

35 Tabla 31

| 60 °C | Aspecto después de tratamiento térmico | Tasa residual (%) | Tasa de recuperación (% , 1 h) | Tasa de recuperación (% , 24 h) | Comentarios |
|--------|----------------------------------------|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 0 kGy | Viscosidad disminuida | - | - | - | Colágeno desnaturalizado |
| 5 kGy | Flexible | - | - | - | Desnaturalizado |
| 25 kGy | Gel contraído transparente | 33,0 | 60,4 | 85,8 | |
| 40 kGy | Gel contraído transparente | 34,2 | 59,0 | 84,5 | |

Tabla 32

| 80 °C | Aspecto después de tratamiento térmico | Tasa residual (%) | Tasa de recuperación (% , 1 h) | Tasa de recuperación (% , 24 h) | Comentarios |
|--------|----------------------------------------|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 0 kGy | Viscosidad disminuida | - | - | - | Colágeno desnaturalizado |
| 5 kGy | Fluido | - | - | - | Colágeno desnaturalizado |
| 25 kGy | Gel contraído transparente | 29,0 | 64,7 | 98,6 | |
| 40 kGy | Gel contraído transparente | 31,2 | 59,3 | 90,6 | |

Tabla 33

| 60 °C/ conteniendo agua | Aspecto después de tratamiento térmico | Tasa residual (%) | Tasa de recuperación (% , 1 h) | Tasa de recuperación (% , 24 h) | Comentarios |
|----------------------------|----------------------------------------|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 0 kGy | Viscosidad disminuida | - | - | - | Colágeno desnaturalizado |
| 5 kGy | Cambió a líquido | - | - | - | Colágeno desnaturalizado |
| 25 kGy | Gel contraído transparente | 55,4 | 99,5 | | |
| 40 kGy | Gel contraído transparente | 67,2 | 99,3 | | |

5 La presente divulgación se refiere a un método para reticular colágeno por radiación y tiene como objetivo proporcionar un hidrogel de colágeno que se usa para apósitos para heridas y materiales de injerto. Se lleva a cabo la reticulación a temperatura ambiente.

10 Específicamente, de acuerdo con la presente divulgación, se usa el gel de colágeno reticulado por radiación de varias maneras como sigue.

15 En primer lugar, como se muestra en la figura 17, se vierte un colágeno parcialmente reticulado obtenido usando una dosis baja de radiación en un molde junto con una solución gelificante para formar un gel. Se vierten las células y un medio en el gel, y se cultivan las células en el gel. Se puede usar el material cultivado (hidrogel) en una mezcla con un componente cosmético, o mezclar con un componente cosmético para proporcionar una mascarilla, o usar como apósito para heridas, o se aplica a una piel lesionada, o usar como material de injerto cutáneo.

20 En segundo lugar, como se muestra en la figura 18, se mezcla un colágeno parcialmente reticulado obtenido usando una dosis baja de radiación con una solución gelificante para formar un gel. Se seca el gel para formar una película fina, después de esto se vierten células y un medio en la película, y se cultivan las células en la película. Se pueden injertar los queratocitos cultivados en un globo ocular.

25 En tercer lugar, como se muestra en la figura 19, se mezcla un colágeno parcialmente reticulado obtenido usando una dosis baja de radiación con una solución gelificante y células, y se cultiva la mezcla. Se puede moler finamente el material cultivado, disponer en una jeringa e injertar en la piel o hueso por inyección.

30 En el presente documento, la solución gelificante que se usa en la presente divulgación es preferentemente una mezcla de hidrogenocarbonato de sodio (NaHCO₃), hidróxido de sodio (NaOH) y HEPES.

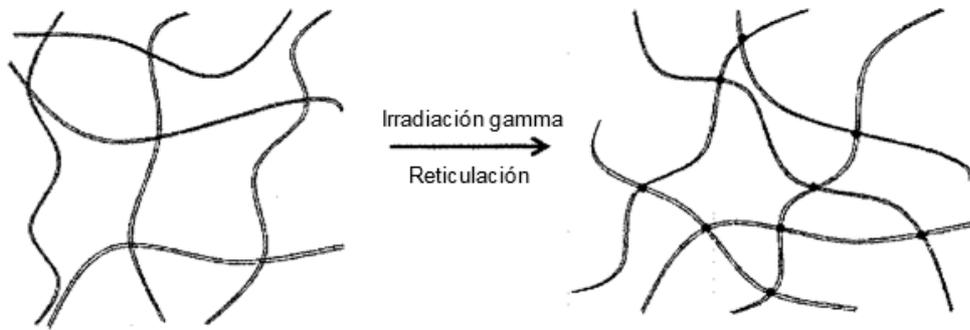
Aplicabilidad industrial

El gel de colágeno reticulado por radiación de acuerdo con la presente divulgación, y el método de preparación y uso del mismo muestran resultados sustancialmente reproducibles. En particular, cuando se lleva a cabo la presente divulgación, puede contribuir al desarrollo de la industria.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un gel de colágeno reticulado por radiación, comprendiendo el método irradiar colágeno líquido con radiación para preparar un colágeno reticulado;
- 5 en el que la radiación es rayos gamma,
- en el que la dosis (tasa de dosis x tiempo) de la radiación es de 0,1-40 kGy/h,
- 10 en el que el método comprende mezclar un 3 % (p/v) de colágeno con uno de un 3 % (p/v) de polímero sintético Pluronic F-127® (poloxámero 407), un 1 % (p/v) de PEO (poli(óxido de etileno) (MW = 100.000) o un 3 % (p/v) de hidroxiapatita, y reticular la mezcla por irradiación con rayos gamma.

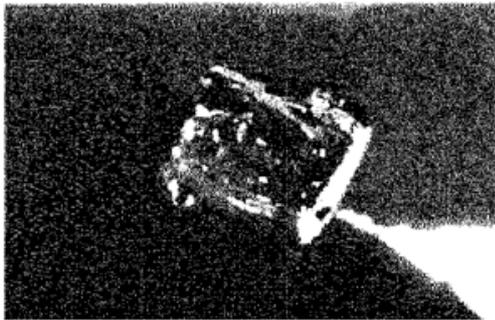
[Fig.1]



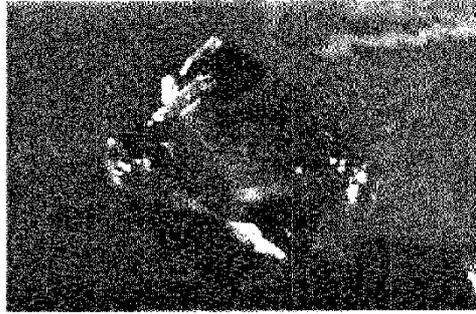
[Fig.2]



[Fig.3]



[Fig.4]



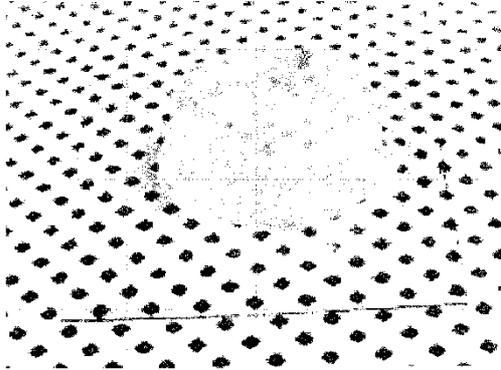
[Fig.5]



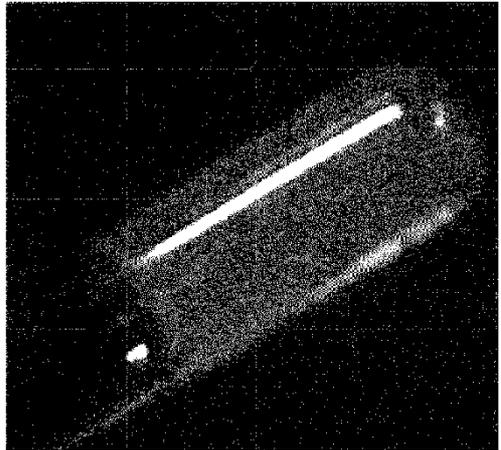
[Fig.6]



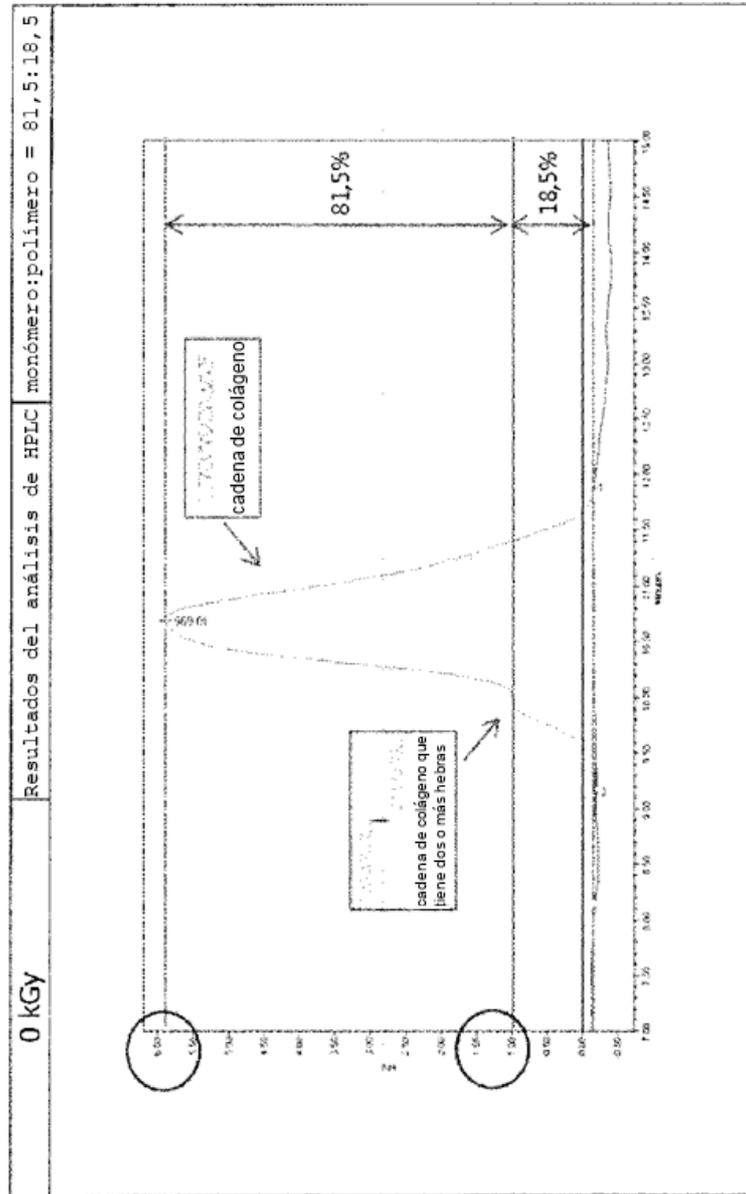
[Fig.7]



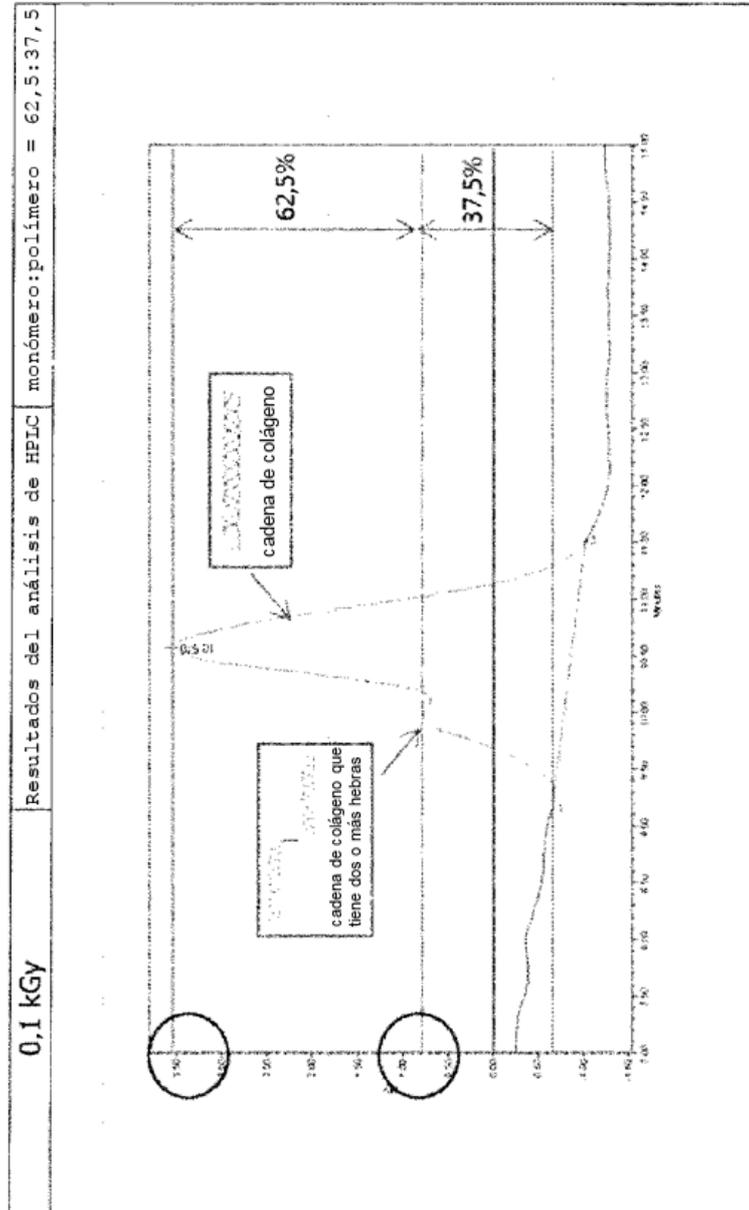
[Fig.8]



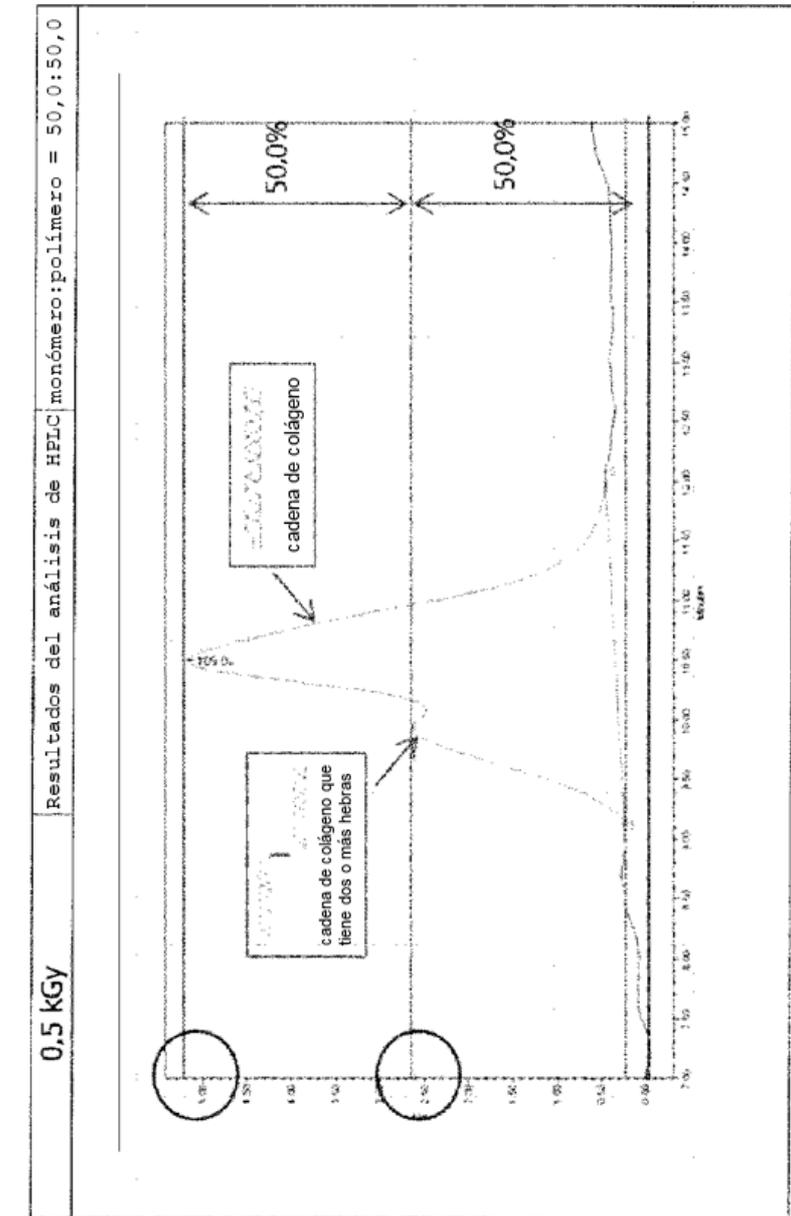
[Fig.9]



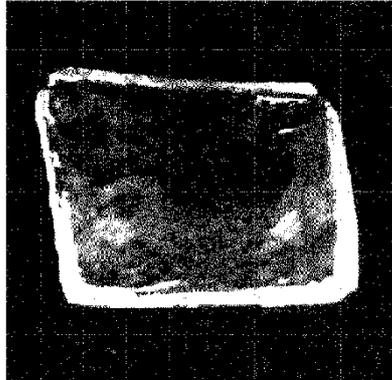
[Fig.10]



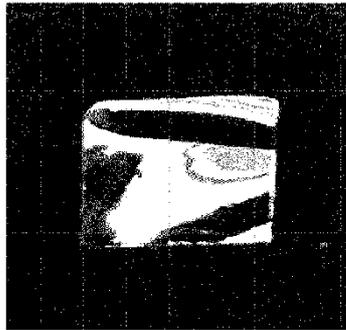
[Fig.11]



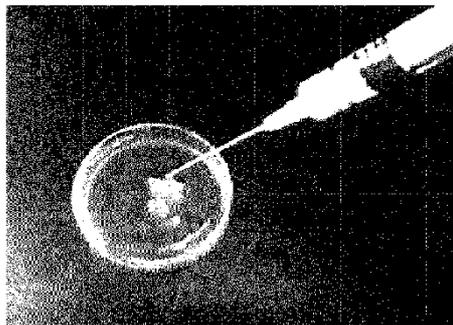
[Fig.12]



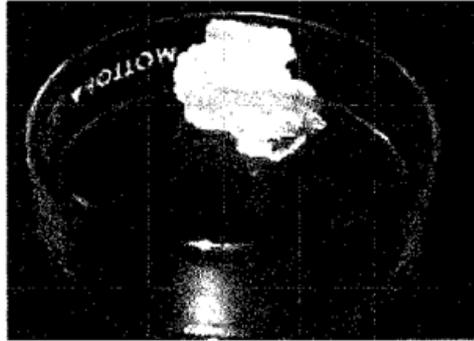
[Fig.13]



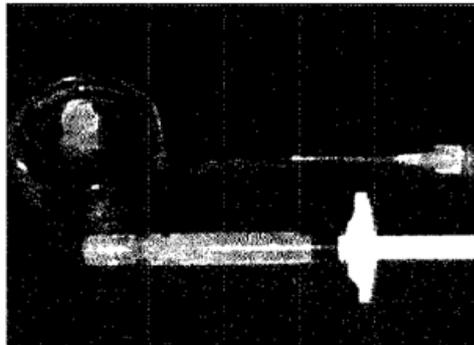
[Fig.14]



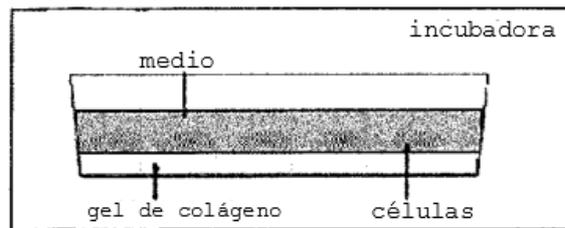
[Fig.15]



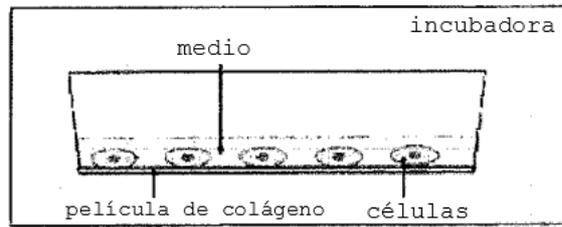
[Fig.16]



[Fig.17]



[Fig.18]



[Fig.19]

