

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 318**

51 Int. Cl.:

A61K 8/65 (2006.01)

A61K 8/73 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2012 PCT/US2012/063228**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13067293**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2012 E 12783840 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2773319**

54 Título: **Matrices de ácido hialurónico-colágeno para aplicaciones de relleno y voluminización dérmicos**

30 Prioridad:

04.11.2011 US 201161555970 P

04.09.2012 US 201213603213

06.09.2012 US 201213605565

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2018

73 Titular/es:

ALLERGAN, INC. (100.0%)

**2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92612, US**

72 Inventor/es:

**YU, XIAOJIE;
MANESIS, NICHOLAS, J. y
POLLOCK, JACOB, F.**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 672 318 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Matrices de ácido hialurónico-colágeno para aplicaciones de relleno y voluminización dérmicos

- 5 La presente solicitud se refiere, en general, a composiciones implantables biocompatibles y se refiere, más específicamente, a composiciones a base de ácido hialurónico-colágeno útiles como materiales de relleno dérmicos.

Sumario

- 10 La presente invención se refiere, en general, a un producto estético para el tejido blando. En un aspecto, el producto comprende un material de relleno que comprende un hidrogel que tiene una forma adecuada para la inyección en tejido humano; y una etiqueta que comprende instrucciones para inyectar el material de relleno en el tejido humano; en el que el hidrogel comprende agua y una matriz macromolecular reticulada descrita en el presente documento.
- 15 Algunas realizaciones incluyen un método de mejora de una cualidad estética del tejido blando de un ser humano, que comprende: inyectar una composición de hidrogel en un tejido blando del ser humano para mejorar de este modo la cualidad estética del tejido blando; en el que la composición de hidrogel comprende agua y una matriz macromolecular reticulada descrita en el presente documento.
- 20 Algunas realizaciones incluyen un método de generación de tejido que comprende poner en contacto un tejido con una composición de hidrogel para generar una cantidad adicional del tejido, en el que la composición de hidrogel comprende agua y una matriz macromolecular reticulada descrita en el presente documento.
- 25 Algunas matrices moleculares reticuladas pueden comprender un componente de ácido hialurónico; y un componente de colágeno; en las que el componente de ácido hialurónico se reticula al componente de colágeno mediante un componente de reticulación; y en las que el componente de reticulación comprende una pluralidad de unidades de reticulación, en las que al menos una parte de las unidades de reticulación comprenden un enlace de éster o un enlace de amida.
- 30 El documento EP 1 419 792 desvela un complejo de glucosaminoglucano-policación como material de matriz para su uso en la regeneración de tejidos, tal como reparación de cartílago, y un método de preparación del mismo. El complejo se sintetiza por reticulación de glucosaminoglucano y policación con un agente de reticulación polifuncional en condiciones fisiológicas. En este método, el agente de reticulación consiste en polietilenglicol que tiene dos o más grupos salientes electrófilos (por ejemplo, grupo succinimidilo o sus derivados) en el extremo carboxilo del mismo, y la concentración del agente de reticulación está en el intervalo de 0,3 a 3 mM. De acuerdo con esta divulgación, la
- 35 reacción de reticulación puede realizarse en condiciones fisiológicas para evitar problemas convencionales de efectos adversos sobre las células (muerte celular) y la formación de un complejo poliónico (precipitado no homogéneo) debido a una reacción de reticulación en alcohol o agua. Se afirma que esta reacción de reticulación puede realizarse en presencia de células mezcladas con el glucosaminoglucano y policación por adelantado.

Breve descripción de los dibujos

Algunos aspectos de la presente divulgación pueden entenderse más claramente con referencia a los dibujos adjuntos, de los cuales:

45 La FIG.1 es un gráfico de barrido de frecuencia y barrido de deformación para un hidrogel de acuerdo con esta divulgación.

La FIG. 2 es un perfil de extrusión a través de una aguja 30G para un hidrogel del ejemplo 4.

50 La FIG. 3 muestra micrografías (a 5X aumentos) de (A) tejido adyacente a una composición de control implantada de gel de ácido hialurónico reticulado comercial, (B) tejido adyacente a una composición implantada del ejemplo 3 y (C) tejido adyacente a una composición implantada del ejemplo 4.

Descripción detallada

Algunas realizaciones incluyen un método de mejora de una cualidad estética del tejido blando de un ser humano. Un método de este tipo puede comprender inyectar una composición de hidrogel, o una composición que comprende un hidrogel, en un tejido blando del ser humano para mejorar, de este modo, la cualidad estética del tejido blando.

60 Algunas realizaciones pueden incluir un producto estético de tejido blando que comprende: un material de relleno que comprende un hidrogel que tiene una forma adecuada para la inyección en tejido humano y una etiqueta que comprende instrucciones para inyectar el material de relleno en el tejido humano.

65 Un material de relleno que comprende un hidrogel o una composición de hidrogel puede ser cualquier tipo de material de relleno que sea adecuado para la inyección en tejido humano para mejorar una cualidad estética de un tejido blando, tal como un material de relleno dérmico, un material de relleno de aumento o reconstrucción de

mamas, un material de relleno de labios, rejuvenecimiento de manos, o similar. Cuando se inyecta, un hidrogel puede estimular el crecimiento y la generación de tejido después de ser inyectado en el tejido blando. En algunas realizaciones, un hidrogel puede estimular la colagénesis después de ser inyectado en el tejido blando.

5 La inyección de un hidrogel que comprende una matriz macromolecular reticulada que comprende un componente de ácido hialurónico que está reticulado a un componente de colágeno puede proporcionar una cualidad estética mejorada durante un período prolongado, en comparación con la inyección de un hidrogel idéntico, excepto que el componente de ácido hialurónico y el componente de colágeno no están reticulados.

10 Algunas realizaciones incluyen un método de generación de tejido que comprende poner en contacto un tejido con una composición de hidrogel para generar una cantidad adicional del tejido. Este método puede usarse para generar tejido tanto *ex vivo* como *in vivo*. En algunas realizaciones, el contacto entre un tejido y un hidrogel puede ser *ex vivo*. En algunas realizaciones, el contacto entre un tejido y un hidrogel puede ser *in vivo*. Los tipos de tejido que se pueden generar incluyen, pero no se limitan a, tejido adiposo, tejido muscular, tejido tendinoso, tejido cardiovascular, 15 tejido neural, tejido óseo y similares.

Algunas realizaciones incluyen un producto envasado que comprende una jeringa cargada con un hidrogel y una aguja. Una jeringa se puede equipar con una aguja de cualquier tamaño que sea apropiada para inyectar el hidrogel en el tejido blando de interés, tal como una aguja con un calibre aproximadamente n.º 25, aproximadamente n.º 30 o 20 un calibre más grande.

Un material de relleno que comprende un hidrogel puede ser adecuado para la inyección si puede inyectarse en el tejido blando de interés sin dificultad irrazonable, e incluye materiales de relleno que pueden dispensarse desde cánulas que tienen un calibre tan pequeño como aproximadamente n.º 30 o aproximadamente n.º 25 a presión 25 manual normal con una plataforma de extrusión lisa.

La inyección de un hidrogel puede proporcionar un aumento de tejido blando que imita los componentes naturales de la piel. Se puede inyectar un hidrogel por vía intradérmica o subcutánea para aumentar el tejido blando y reparar o corregir anomalías congénitas, defectos adquiridos o defectos cosméticos. Los ejemplos de dichas afecciones 30 incluyen anomalías congénitas tales como microsomía hemifacial, hipoplasia malar y cigomática, hipoplasia mamaria unilateral, tórax infundibuliforme, agenesia pectoral (anomalía de Poland) e insuficiencia velofaríngea secundaria a la reparación de fisura palatina, o fisura palatina submucosa (como implante retrofaríngeo); defectos adquiridos (postraumáticos, posquirúrgicos o postinfecciosos) tales como cicatrices deprimidas, atrofia subcutánea (por ejemplo, secundaria a lupus eritematoso discoide), lesiones queratósicas, enoftalmos en el ojo anucleado (también 35 síndrome de escotadura superior), cicatrices de acné en la cara, esclerodermia lineal con atrofia subcutánea, deformidad nasal en silla de montar, enfermedad de Romberg y parálisis unilateral de las cuerdas vocales; y defectos cosméticos tales como líneas del ceño glabellar, pliegues nasolabiales profundos, arrugas geográficas peribucles, mejillas hundidas e hipoplasia mamaria.

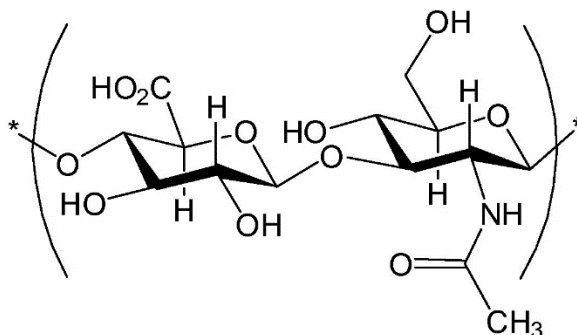
El ácido hialurónico reticulado, el colágeno y el colágeno reticulado, tales como los usados en los materiales de relleno dérmicos, no promueven la infiltración celular y el crecimiento hacia dentro del tejido. De forma similar, el colágeno simplemente mezclado en hidrogeles de ácido hialurónico no promueve la integración tisular o la 40 generación de tejido de novo. Sin embargo, algunos hidrogeles descritos en el presente documento promueven la migración celular al interior de los hidrogeles y la formación de tejido dentro de los geles cuando se implantan *in vivo*.

Un hidrogel puede comprender agua, y una matriz macromolecular reticulada. Normalmente, una matriz molecular reticulada puede comprender un componente de ácido hialurónico y un componente de colágeno, en la que el componente de ácido hialurónico se reticula al componente de colágeno mediante un componente de reticulación. 50 Un componente de reticulación puede comprender una pluralidad de unidades de reticulación, en el que al menos una parte de las unidades de reticulación comprende un enlace éster o un enlace amida.

Se puede sintetizar una matriz macromolecular reticulada para un hidrogel acoplando un ácido hialurónico con un colágeno usando un agente de acoplamiento, tal como una carbodiimida. En estos hidrogeles, el ácido hialurónico 55 puede servir como un componente de unión al agua biocompatible, que proporciona degradación en masa e isovolumétrica. Adicionalmente, el colágeno puede transmitir dominios de señalización y adhesión celular para promover la unión celular, la migración y otras funciones celulares tales como el depósito de matriz extracelular. Los biopolímeros forman hidrogeles homogéneos con composición, hinchamiento y propiedades mecánicas ajustables. Se puede hacer que las composiciones sean inyectables para una implantación mínimamente invasiva a través de 60 una jeringa y una aguja.

El ácido hialurónico es un glucosaminoglucano no sulfatado que potencia la retención de agua y resiste la carga de trabajo hidrostática. No es inmunógeno y puede modificarse químicamente de muchas maneras. El ácido hialurónico puede ser aniónico a intervalos de pH alrededor o por encima del pKa de sus grupos ácido carboxílico.

65



Ácido hialurónico

El colágeno es una proteína que forma fibrillas y láminas que soportan cargas de tracción. El colágeno también tiene sitios de unión a integrinas específicos para la adhesión celular y se sabe que promueve la unión, la migración y la proliferación celulares. El colágeno puede estar cargado positivamente debido a su alto contenido de restos de aminoácidos básicos tales como arginina, lisina e hidroxilisina.

Debido a que el ácido hialurónico puede ser aniónico y el colágeno puede ser catiónico, las dos macromoléculas pueden formar complejos poliónicos en solución acuosa. Un complejo poliónico puede ser significativamente menos soluble en agua que el ácido hialurónico o el colágeno y, por tanto, puede separarse por precipitación de la solución acuosa cuando las dos macromoléculas están juntas en una mezcla.

En ciertas condiciones, un ácido hialurónico y un colágeno pueden combinarse en un líquido acuoso en el que ambos componentes son solubles. Entonces, se pueden reticular un ácido hialurónico y un colágeno, mientras que ambos estén disueltos en una solución acuosa para formar un hidrogel. Las condiciones de reacción tales como la concentración de ácido hialurónico, la concentración de colágeno, el pH de la solución y la concentración de sales pueden ajustarse para ayudar a prevenir la formación de complejos poliónicos entre el ácido hialurónico aniónico y el colágeno catiónico. También pueden ayudar a prevenir la formación de microfibrillas de colágeno.

Algunas realizaciones incluyen un método de reticulación de ácido hialurónico y colágeno. Este método generalmente comprende una etapa de disolución que da como resultado una solución acuosa previa a la reacción. En una etapa de disolución, el ácido hialurónico y el colágeno se disuelven en una solución acuosa que tiene un pH bajo y/o una sal para formar una solución acuosa previa a la reacción.

Un método de reticulación de ácido hialurónico-colágeno comprende además una etapa de activación. En una etapa de activación, una solución acuosa previa a la reacción se modifica al menos añadiendo un agente de acoplamiento soluble en agua y/o aumentando el pH de la solución. Si fuera necesario, también se puede añadir una sal para mantener el ácido hialurónico y el colágeno en solución a un pH más alto. De este modo, una mezcla de reacción de reticulación comprende ácido hialurónico y colágeno disueltos o dispersados en un medio acuoso, un agente de acoplamiento soluble en agua y una sal, y tiene un pH más alto que la solución acuosa previa a la reacción de la que derivó. La mezcla de reacción de reticulación se deja reaccionar para reticular de este modo el ácido hialurónico y el colágeno.

En algunas realizaciones, el pH de la solución de acuosa previa a la reacción puede aumentarse y se puede permitir que se produzca una cantidad sustancial de formación de fibras en la solución antes de añadir el agente de acoplamiento soluble en agua. En algunas realizaciones, el agente de acoplamiento soluble en agua se puede añadir a la solución acuosa previa a la reacción antes de que se produzca sustancialmente cualquier formación de fibras.

Una mezcla de reacción de reticulación puede reaccionar para formar una matriz macromolecular reticulada. Dado que la reacción se produce en una solución acuosa, se puede dispersar una matriz macromolecular reticulada en un líquido acuoso en forma de hidrogel a medida que se forma mediante una reacción de reticulación. Una matriz macromolecular reticulada se puede mantener en forma de hidrogel porque, en muchos casos, una matriz macromolecular reticulada se puede usar en forma de hidrogel.

En algunas realizaciones, una solución acuosa previa a la reacción o una mezcla de reacción de reticulación pueden comprender, además, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 90 % de un disolvente orgánico en el que el ácido hialurónico tiene mala solubilidad, tal como etanol, metanol, isopropanol o similares.

Después de que se ha producido una reacción de reticulación, la matriz macromolecular reticulada puede adquirir

forma de partículas u homogeneizarse a través de una malla. Esto puede ayudar a formar una suspensión o hidrogel inyectable. Una malla usada para dar forma de partículas a una matriz macromolecular reticulada puede tener cualquier tamaño de poro adecuado dependiendo del tamaño de partículas deseado. En algunas realizaciones, la malla puede tener un tamaño de poro de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 100 micrómetros, de aproximadamente 50 micrómetros a aproximadamente 70 micrómetros, o aproximadamente 60 micrómetros.

Un hidrogel que comprende una matriz molecular reticulada se puede tratar por diálisis para esterilización u otros fines. La diálisis se puede realizar colocando una membrana semipermeable entre el hidrogel y otro líquido para permitir que el hidrogel y el líquido intercambien moléculas o sales que puedan pasar entre la membrana.

Una membrana de diálisis puede tener un límite de peso molecular que puede variar. Por ejemplo, el límite puede ser de aproximadamente 5.000 Dalton a aproximadamente 100.000 Dalton, de aproximadamente 10.000 Dalton a aproximadamente 30.000 Dalton, o aproximadamente 20.000 Dalton.

La diálisis puede realizarse contra una solución tampón, o el líquido en el otro lado de la membrana del hidrogel puede ser una solución tampón. En algunas realizaciones, la solución tampón puede ser una solución tampón de fosfato estéril que puede comprender tampón de fosfato, cloruro de potasio y/o cloruro de sodio. Una solución tampón de fosfato estéril puede ser sustancialmente isosmótica con respecto al fluido fisiológico humano. De este modo, cuando se completa la diálisis, el componente líquido de un hidrogel puede ser sustancialmente isosmótico con respecto al fluido fisiológico humano.

En algunas realizaciones, un complejo macromolecular reticulado puede comprender, además, un líquido acuoso. Por ejemplo, el complejo macromolecular reticulado puede absorber el líquido acuoso de modo que se forme un hidrogel. Un líquido acuoso puede comprender agua con una sal disuelta en ella, tal como un tampón de fosfato, cloruro de sodio, cloruro de potasio, etc. En algunas realizaciones, un líquido acuoso puede comprender agua, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, cloruro de potasio a una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 3 mM, y tampón de fosfato a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, donde el pH del líquido es de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.

Se puede usar un hidrogel en un producto estético de tejido blando. Un producto estético de tejido blando puede comprender: un dispositivo estético que tiene una forma adecuada para la inyección o implantación en tejido humano; y una etiqueta que comprende instrucciones para inyectar o implantar el componente estético en tejido humano; donde el dispositivo estético comprende una matriz macromolecular reticulada descrita en el presente documento. Algunos productos pueden comprender la matriz macromolecular reticulada en forma de hidrogel.

Algunas realizaciones incluyen un método de mejora de una cualidad estética de una característica anatómica de un ser humano que comprende: inyectar o implantar un dispositivo estético en un tejido del ser humano para mejorar, de este modo, la cualidad estética de la característica anatómica; donde el dispositivo estético comprende una matriz macromolecular reticulada descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la matriz macromolecular reticulada usada en el producto puede estar en forma de hidrogel.

En algunas realizaciones, un hidrogel de un complejo macromolecular reticulado puede tener un módulo de almacenamiento de aproximadamente 1 Pa a aproximadamente 10.000 Pa, de aproximadamente 50 Pa a 10.000 Pa, de aproximadamente 500 Pa a aproximadamente 1000 Pa, aproximadamente 556 Pa, aproximadamente 560 Pa, aproximadamente 850 Pa, aproximadamente 852 Pa, o cualquier valor en un intervalo limitado por, o entre, cualquiera de estos valores.

En algunas realizaciones, un hidrogel de un complejo macromolecular reticulado puede tener un módulo de pérdida de aproximadamente 1 Pa a aproximadamente 500 Pa, de aproximadamente 10 Pa a 200 Pa, de aproximadamente 100 Pa a aproximadamente 200 Pa, aproximadamente 20 Pa, aproximadamente 131 Pa, aproximadamente 152 Pa, o cualquier valor en un intervalo limitado por, o entre, cualquiera de estos valores.

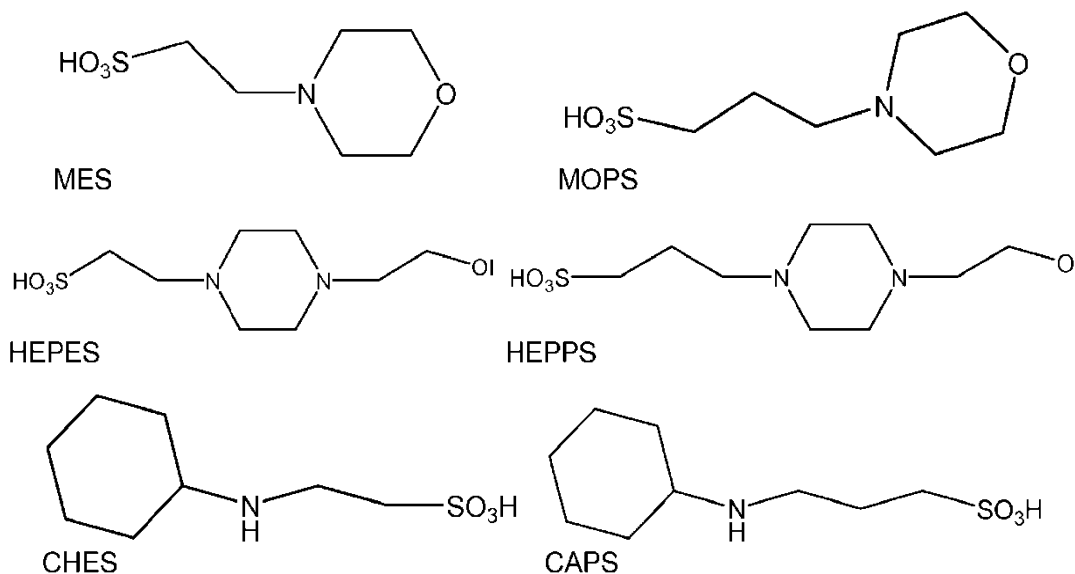
En algunas realizaciones, un hidrogel de un complejo macromolecular reticulado puede tener una fuerza de extrusión promedio de aproximadamente 20 N a 30 N, o aproximadamente 25 N, cuando el hidrogel es empujado a través de una jeringa con aguja 30G moviendo el émbolo de una jeringa de 1 ml que contiene el hidrogel a una velocidad de 100 mm/min durante aproximadamente 11 mm, y midiendo la fuerza promedio desde aproximadamente 4 mm hasta aproximadamente 10 mm.

Un complejo macromolecular reticulado puede tener propiedades de hinchamiento ajustables basadas en las condiciones de reacción y la dilución de hidrogel. En algunas realizaciones, un complejo macromolecular reticulado puede tener una relación de hinchamiento de aproximadamente 1 a aproximadamente 7. Una relación de hinchamiento es la relación del peso del complejo macromolecular reticulado cuando se satura con agua respecto al peso del complejo macromolecular reticulado sin agua. Más específicamente, la relación de hinchamiento es la relación de la masa del gel que se ha permitido que se hinche completamente respecto a la masa del gel en su concentración inicial.

- En una reacción de reticulación, el peso molecular de un ácido hialurónico puede variar. En algunas realizaciones, un ácido hialurónico puede tener un peso molecular de aproximadamente 500.000 Dalton a aproximadamente 10.000.000 Dalton, de aproximadamente 1.000.000 Dalton a aproximadamente 5.000.000 Dalton, o de aproximadamente 1.000.000 Dalton a aproximadamente 3.000.000 Dalton. Cuando se produce la reacción de reticulación, el producto macromolecular reticulado resultante puede tener un componente de ácido hialurónico derivado del ácido hialurónico en la reacción de reticulación. De este modo, los intervalos mencionados anteriormente también pueden aplicarse al peso molecular de un componente de ácido hialurónico, por ejemplo de aproximadamente 500.000 Dalton a aproximadamente 10.000.000 Dalton, de aproximadamente 1.000.000 Dalton a aproximadamente 5.000.000 Dalton, o de aproximadamente 1.000.000 Dalton a aproximadamente 3.000.000 Dalton. La expresión "peso molecular" se aplica en esta situación a una parte de la matriz, incluso aunque el componente de ácido hialurónico puede no ser en realidad una molécula independiente debido a la reticulación.
- La concentración de ácido hialurónico en una solución acuosa previa a la reacción o una mezcla de reacción de reticulación puede variar. En algunas realizaciones, el ácido hialurónico está presente a de aproximadamente 3 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 6 mg/ml a aproximadamente 24 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 1,7 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml o aproximadamente 24 mg/ml.
- Puede usarse cualquier tipo de colágeno en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, puede usarse colágeno de tipo I, colágeno de tipo III, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo VI, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un colágeno o un componente de colágeno comprende colágeno de tipo I o colágeno de tipo III. En algunas realizaciones, el componente de colágeno comprende colágeno de tipo V.
- Un colágeno puede derivar de un cultivo celular, tejido animal o medios recombinantes, y puede derivar de fuentes humanas, porcinas o bovinas. Algunas realizaciones comprenden colágeno derivado del cultivo de fibroblastos humanos. Algunas realizaciones comprenden colágeno que se ha desnaturalizado a gelatina. Las condiciones de extracción/procesamiento de la fuente y/o el colágeno pueden alterar la forma en que las macromoléculas de colágeno se unen para formar estructuras supramoleculares. Estas estructuras de orden superior pueden tener efectos sobre las propiedades físicas del gel (rigidez, viscosidad) y también pueden tener un efecto sobre la reactividad del colágeno a los reactivos de reticulación.
- La concentración de colágeno en una solución acuosa previa a la reacción o una mezcla de reacción de reticulación puede variar. En algunas realizaciones, el colágeno puede estar presente a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 3 mg/ml a aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 1,7 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml o aproximadamente 12 mg/ml. La concentración de colágeno tiene un efecto sobre las propiedades físicas del gel (rigidez, viscosidad). En general, las concentraciones más altas de colágeno conducen a un módulo elástico más alto.
- En algunas realizaciones de la presente divulgación, la relación en peso de ácido hialurónico respecto a colágeno en una solución acuosa previa a la reacción o una solución acuosa previa a la reacción o una mezcla de reacción de reticulación (por ejemplo [peso de ácido hialurónico]/[peso de colágeno]) puede ser de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2, aproximadamente 1 o aproximadamente 2. Cuando se produce la reacción de reticulación, el producto macromolecular reticulado resultante puede tener un componente de colágeno derivado del colágeno en la reacción de reticulación. De este modo, la matriz macromolecular reticulada resultante de la presente divulgación puede tener una relación en peso de componente de ácido hialurónico respecto a componente de colágeno que corresponde a la relación en peso en la reacción de reticulación, por ejemplo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2, aproximadamente 1 o aproximadamente 2. En la presente invención, la relación en peso del componente de ácido hialurónico respecto al componente de colágeno en la matriz macromolecular reticulada es 2.
- En otras realizaciones de la divulgación, las composiciones tienen una relación de AH respecto a colágeno de entre aproximadamente 0,5 a 1 y aproximadamente 7 a 1.
- Una sal puede ayudar a cribar las cargas negativas del ácido hialurónico respecto a las cargas positivas de colágeno y, de este modo, puede evitar la precipitación de un complejo de iones poliónico a partir de la solución. Sin embargo, altas concentraciones de sal pueden reducir la solubilidad de algunos componentes en la solución. De este modo, en algunas realizaciones, la concentración de sal de una solución acuosa previa a la reacción o una mezcla de reacción de reticulación puede ser lo suficientemente alta para detectar las cargas de modo que no se forme el complejo de iones poliónico, pero también suficientemente bajo para que los componentes de la mezcla permanezcan en solución. Por ejemplo, la concentración total de sal de algunas soluciones acuosas previas a la reacción o mezclas de reacción de reticulación puede ser de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M, por ejemplo, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 0,5 M, por ejemplo, entre aproximadamente 2 mM y

aproximadamente 0,2 M.

Algunas sales en una solución acuosa previa a la reacción o una mezcla de reacción de reticulación pueden ser tampones no coordinantes. Se puede usar cualquier tampón no coordinante que sea capaz de tamponar la mezcla y no se coordine con átomos o iones metálicos en el colágeno. En algunas realizaciones, el tampón no reacciona con los reactivos de reticulación (carbodiimida y aditivo). Por ejemplo, los tampones de acetato o fosfato no pueden usarse en estas realizaciones. Los ejemplos de tampones no coordinantes adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil)etanosulfónico (HEPES), ácido 3-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]propanosulfónico (HEPPS), ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (CHES), ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico (CAPS), etc.



La concentración de un tampón no coordinante puede variar. Por ejemplo, algunas soluciones acuosas previas a la reacción o mezclas de reacción de reticulación pueden tener una concentración de tampón en un intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM o de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 250 mM. Algunas soluciones acuosas previas a la reacción o mezclas de reacción de reticulación comprenden MES a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 180 mM.

También se pueden incluir sales no tamponantes en una solución acuosa previa a la reacción o una mezcla de reacción de reticulación como una alternativa a, o además de, sales tamponantes. Algunos ejemplos pueden incluir cloruro de sodio, cloruro de potasio, bromuro de potasio, bromuro de sodio, cloruro de litio, bromuro de litio, yoduro de sodio y yoduro de potasio. La concentración de una sal no tamponante puede variar. Por ejemplo, algunas mezclas pueden tener una concentración de sal no tamponante en un intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 500 mM o de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM. En algunas realizaciones, el cloruro de sodio puede estar presente en una concentración en un intervalo de aproximadamente el 0,5 % p/v a aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 0,9 % p/v, aproximadamente el 1,6 % p/v, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 50 a 300 mM, de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 330 mM, aproximadamente 150 mM, o aproximadamente 270 mM.

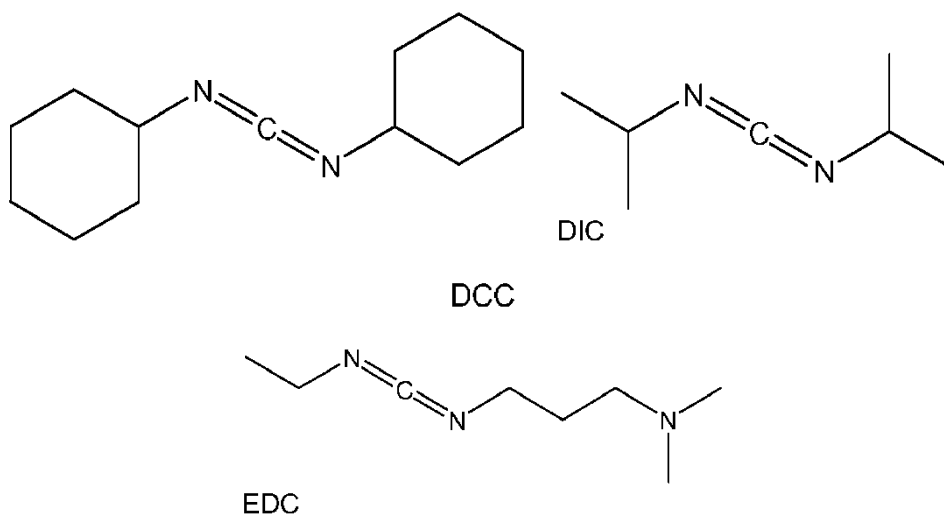
El pH de una solución de acuosa previa a la reacción puede ser menor que el pH de una mezcla de reacción de reticulación. Si el contenido de sal de la solución acuosa previa a la reacción es bajo, el pH puede ser menor para potenciar la solubilidad del ácido hialurónico y el colágeno. Si el contenido de sal es más alto, el pH puede ser más alto en la solución acuosa previa a la reacción. En algunas realizaciones, el pH de la mezcla acuosa previa a la reacción es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8, de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, de aproximadamente 4 a aproximadamente 6, de aproximadamente 4,7 a aproximadamente 7,4, o aproximadamente 5,4. Para bajas concentraciones de sal, el pH puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3.

En algunas realizaciones, el pH puede ajustarse a neutro para permitir la gelificación del colágeno o la formación de fibras antes de añadir un agente de acoplamiento.

En algunas realizaciones, el pH puede ajustarse a neutro inmediatamente antes, aproximadamente en el momento,

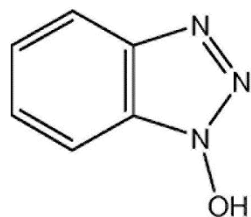
o después de añadir un agente de acoplamiento, de modo que la gelificación de colágeno se reduzca o no se produzca sustancialmente.

Puede usarse cualquier agente de acoplamiento soluble en agua que pueda reticular ácido hialurónico a colágeno. Algunos ejemplos no limitantes de un agente de acoplamiento incluyen carbodiimidas tales como N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Los agentes de acoplamiento de carbodiimida pueden facilitar la formación de enlaces éster o amida sin convertirse en parte del enlace. Sin embargo, pueden usarse otros agentes de acoplamiento que se vuelven parte del grupo de reticulación. La concentración de un agente de acoplamiento puede variar. En algunas realizaciones, un agente de acoplamiento puede estar presente a de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, el agente de acoplamiento es EDC que está presente a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 50 mM.

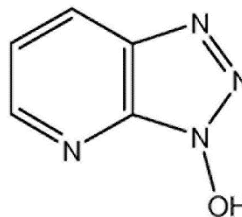


Como resultado de una reacción de reticulación, una matriz macromolecular reticulada puede comprender un componente de reticulación que reticula o conecta covalentemente el componente de ácido hialurónico al componente de colágeno. Un componente de reticulación comprende una pluralidad de unidades de reticulación, o uniones por enlace covalente individuales, entre el componente de ácido hialurónico y el componente de colágeno. Al menos una parte de las unidades de reticulación comprende un enlace éster o un enlace amida. En algunas realizaciones, al menos una parte de las unidades de reticulación puede ser -CON- o -CO₂-, donde N es un nitrógeno de un resto de aminoácido.

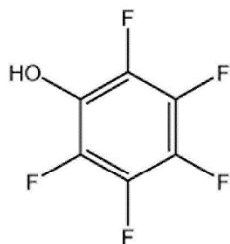
Se puede usar un agente de activación para aumentar la relación de enlaces amida respecto a enlaces éster formados en el producto reticulado. En algunas realizaciones, un agente de activación puede ser un triazol tal como hidroxibenzotriazol (HOBt) o 1-hidroxí-7-azabenzotriazol (HOAT); un fenol fluorado tal como pentafluorofenol; una succinimida tal como N-hidroxisuccinimida (NHS) o N-hidroxisulfosuccinimida (sulfoNHS), y similares.



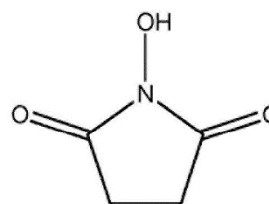
HOBT



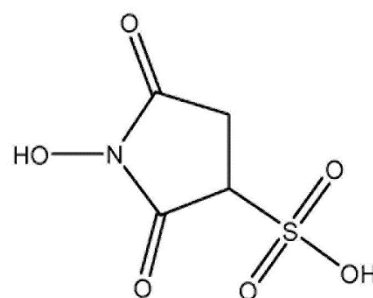
HOAT



Pentafluorofenol



NHS



sulfoNHS

La concentración de un agente de activación puede variar. En algunas realizaciones, el agente de activación puede tener una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, el agente de activación puede ser NHS o sulfoNHS a una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, el agente de activación puede ser N-hidroxisulfosuccinimida, sal sódica, a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 50 mM.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender un agente de acoplamiento de carbodiimida y un agente de activación. En algunas realizaciones, el agente de acoplamiento es EDC y el agente de activación es NHS o sulfoNHS. En algunas realizaciones, EDC está presente a una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM y NHS o sulfoNHS está presente a de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 1,7 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 1,7 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 100 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 0,9 % en peso o aproximadamente 150 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, donde la solución tiene un pH de aproximadamente 5,4.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 6 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 6 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 180 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 1,6 % en peso o aproximadamente 270 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, donde la solución tiene un pH de aproximadamente 5,4.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 16 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 8 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 100 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 0,9 % en peso o aproximadamente 150 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, donde la solución tiene un pH de entre aproximadamente 4,5 y 5,5, por ejemplo aproximadamente 5,2.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 12 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 12 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 100 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 0,9 % en peso o aproximadamente 150 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 50 mM.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 3 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 3 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 100 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 0,9 % en peso o aproximadamente 150 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, donde la solución tiene un pH de aproximadamente 5,4.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 12 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 6 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 100 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 0,9 % en peso o aproximadamente 150 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, donde la solución tiene un pH de aproximadamente 5,4.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 24 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 12 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 100 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 0,9 % en peso o aproximadamente 150 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, donde la solución tiene un pH de aproximadamente 5,4.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 200 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 0,5 % en peso a aproximadamente el 2 % en peso o de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 330 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, donde la solución tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.

En lo sucesivo, los ejemplos 1, 2, 4, 5, 11, 12 y 13 no forman parte de la invención y se proporcionan solo con fines de información.

Ejemplo 1

Método de elaboración de una composición inyectable

Se produjeron soluciones de ácido hialurónico (AH) y colágeno disolviendo 15 mg de ácido hialurónico 2,0 MDa en 5 ml de solución de colágeno humano (III) a 3 mg/ml en ácido clorhídrico 0,01 N (Fibrogen). La solución de ácido hialurónico/colágeno se liofilizó a continuación a -50 °C y 0,02 Torr (2,66 Pa). Las esponjas resultantes se empaparon en 20 ml de mezcla de etanol:agua en relaciones que variaban de 1:2 a 5:1 con 50 mM de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y 50 mM de sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida durante 24 horas. Los geles reticulados se lavaron a continuación en isopropanol al 70 %/agua al 30 % para su esterilización, seguido de cinco lavados en tampón de fosfato estéril para su purificación.

Ejemplo 2

Método de elaboración de una composición inyectable

Se creó una solución de AH a 3,4 mg/ml disolviendo 34 mg de AH 2 MDa en 10 ml de tampón MES 100 mM con el 0,9 % en peso de NaCl, pH 4,7. Tras la hidratación y disolución completas del AH, esta solución se mezcló con 10 ml de solución de colágeno humano (III) de 3,4 mg / ml en HCl 100 mM. El pH de la solución resultante de AH/colágeno (III) se ajustó a 5,4 con solución de NaOH 10 mM. Se añadieron EDC (192 mg) y 217 mg de sulfoNHS (50 mM cada uno) a la solución de AH/colágeno (III) y se mezclaron completamente. La reacción de reticulación continuó durante 18 horas antes de que el gel se obtuviera en forma de partículas haciéndolo pasar a través de una malla de tamaño de poro de 100 micrómetros.

Ejemplo 3**Método de elaboración de una composición inyectable**

Se concentró colágeno (I) de cola de rata en ácido clorhídrico 0,01 N (Invitrogen) de 5 mg/ml a 8 mg/ml usando un dispositivo de filtración centrífuga con un límite de peso molecular de 20 kDa. Se añadió AH (160 mg, 2 MDa) a 10 ml de la solución de colágeno y se dejó hidratar durante 60 minutos. La solución se homogeneizó a continuación pasando de jeringa a jeringa a través de un conector Luer-Luer. Se añadieron NaCl (93 mg) y 201 mg de MES a la solución y se mezclaron. Se añadieron EDC (98 mg) y 111 mg de sulfoNHS a la solución y se mezclaron rápidamente. Finalmente, se añadieron 200 µl de NaOH 1 N a la solución que se mezcló pasando de jeringa a jeringa. La solución de reacción se transfirió a un vial de vidrio y se centrifugó durante 5 min a 4000 RPM para eliminar las burbujas de aire. A continuación, el gel se obtuvo en forma de partículas haciéndolo pasar a través de una malla de tamaño de poro de 60 micrómetros. Después del dimensionamiento, el gel se esterilizó por diálisis a través de una membrana de éster de celulosa de límite de peso molecular de 20 kDa contra isopropanol al 70 %/agua al 30 % durante 3 horas a 4 °C. A continuación, se continuó la diálisis contra tampón de fosfato estéril durante 48 horas a 4 °C con tres cambios de tampón. El gel se dispensó en jeringas en condiciones asépticas.

Ejemplo 4**Método de elaboración de una composición inyectable**

Se concentró colágeno (I) de cola de rata en ácido clorhídrico 0,01 N (Invitrogen) de 5 mg/ml a 12 mg/ml usando un dispositivo de filtración centrífuga con un límite de peso molecular de 20 kDa. Se añadió AH (120 mg, 2 MDa) a 10 ml de la solución de colágeno y se dejó hidratar durante 60 minutos. La solución se homogeneizó a continuación pasando de jeringa a jeringa a través de un conector Luer-Luer. Se añadieron NaCl (93 mg) y 201 mg de MES a la solución y se mezclaron. Se añadieron EDC (98 mg) y 111 mg de sulfoNHS a la solución y se mezclaron rápidamente. Finalmente, se añadieron 200 µl de NaOH 1 N a la solución que se mezcló pasando de jeringa a jeringa. La solución de reacción se transfirió a un vial de vidrio y se centrifugó durante 5 min a 4000 RPM para eliminar las burbujas de aire. A continuación, el gel se obtuvo en forma de partículas haciéndolo pasar a través de una malla de tamaño de poro de 60 micrómetros. Después del dimensionamiento, el gel se esterilizó por diálisis a través de una membrana de éster de celulosa de límite de peso molecular de 20 kDa contra isopropanol al 70 %/agua al 30 % durante 3 horas a 4 °C. A continuación, se continuó la diálisis contra tampón de fosfato estéril durante 48 horas a 4 °C con tres cambios de tampón. El gel se dispensó en jeringas en condiciones asépticas.

Ejemplo 5**Método de elaboración de una composición inyectable**

Se concentró colágeno (I) de cola de rata en ácido clorhídrico 0,01 N (Invitrogen) de 5 mg/ml a 12 mg/ml usando un dispositivo de filtración centrífuga con un límite de peso molecular de 20 kDa. Se añadió AH (120 mg, 2 MDa) a 10 ml de la solución de colágeno y se dejó hidratar durante 60 minutos. La solución se homogeneizó a continuación pasando de jeringa a jeringa a través de un conector Luer-Luer. Se añadieron NaCl (93 mg), 201 mg de MES y 200 µl de NaOH 1 N a la solución, se mezclaron y se les dio 45 minutos para la polimerización del colágeno. A continuación, se añadieron EDC (98 mg) y 111 mg de sulfoNHS y la solución final se mezcló pasando de jeringa a jeringa. La solución de reacción se transfirió a un vial de vidrio y se centrifugó durante 5 min a 4000 RPM para eliminar las burbujas de aire. A continuación, el gel se obtuvo en forma de partículas haciéndolo pasar a través de una malla de tamaño de poro de 60 micrómetros. Después del dimensionamiento, el gel se esterilizó por diálisis a través de una membrana de éster de celulosa de límite de peso molecular de 20 kDa contra isopropanol al 70 %/agua al 30 % durante 3 horas a 4 °C. A continuación, se continuó la diálisis contra tampón de fosfato estéril durante 48 horas a 4 °C con tres cambios de tampón. El gel se dispensó en jeringas en condiciones asépticas.

Ejemplo 6**Caracterización reológica de las composiciones**

Se usó la reología de placas paralelas oscilatorias para caracterizar las propiedades mecánicas de geles usando un

Anton Paar MCR 301. Se usó un diámetro de placa de 25 mm a una altura de hueco de 1 mm. Se aplicó un barrido de frecuencia de 0,1 a 10 Hz a una deformación fija del 2 % con aumento logarítmico de la frecuencia, seguido de un barrido de deformación entre el 0,1 % y el 300 % a una frecuencia fija de 5 Hz con aumento logarítmico de la deformación. El módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') se determinaron a partir de mediciones de barrido de frecuencia a 5 Hz.

El gel del ejemplo 4 tenía un módulo de almacenamiento (G') de 556 Pa y un módulo de pérdida (G'') de 131 Pa. El barrido de frecuencia (A) y el barrido de deformación (B) se muestran en la figura 1.

Ejemplo 7

Ensayo de extrusión

Con el fin de determinar la fuerza requerida para extrudir los geles, estos se expulsaban desde jeringas BD de 1 ml a través de agujas 30G usando un Instron 5564 con software Bluehill 2. El émbolo se empujó a una velocidad de 100 mm/min durante 11,35 mm y se registró el perfil de extrusión.

El perfil de extrusión a través de una aguja 30G para gel del ejemplo 4 se muestra en la figura 2. El gel tenía una fuerza de extrusión promedio de 25 N de 4 a 10 mm.

Ejemplo 8

Método de elaboración de materiales de relleno dérmico

Se disolvió ácido hialurónico, con un peso molecular de 2 MDa, en una solución de colágeno humano (I) en ácido clorhídrico 0,01 N (Advanced BioMatrix). Se añadió cloruro de sodio al 0,9 % en peso y se añadió ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a 100 mM a la solución y se mezcló. El ácido hialurónico se dejó hidratar durante 1 h y la solución se homogeneizó mediante mezcla de jeringa a jeringa. El pH de la solución se ajustó a 5,4 mediante adición de hidróxido de sodio 1 N. Se añadieron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (50 mM) y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida (50 mM) a la solución de ácido hialurónico/colágeno y se mezclaron rápidamente mediante transferencia de jeringa a jeringa. La solución se transfirió a un vial de vidrio y se centrifugó durante 5 min a 4000 RPM para eliminar las burbujas de aire. El gel resultante se dejó reaccionar durante 16 horas a 4 °C. A continuación, el gel se obtuvo en forma de partículas haciéndolo pasar a través de una malla de tamaño de poro de 100 micrómetros. Después del dimensionamiento, el gel se esterilizó por diálisis a través de una membrana de éster de celulosa de límite de peso molecular de 20 kDa contra isopropanol al 70 %/ agua al 30 % durante 3 horas a 4 °C. A continuación, se continuó la diálisis contra tampón de fosfato estéril, pH 7,4, durante 48 horas a 4 °C con cuatro cambios de tampón. El gel se dispensó en jeringas en condiciones asépticas.

Este procedimiento se usó para producir hidrogeles con concentraciones variables de ácido hialurónico y colágeno. Cuando se requirió, el colágeno humano (I) en ácido clorhídrico 0,01 N se concentró desde 3 mg/ml hasta la concentración de reacción deseada en dispositivos de filtración centrífuga con límite de peso molecular de 20 kDa. Se sintetizó una muestra de 50 ml de cada gel, se esterilizó mediante exposición a isopropanol al 70 % y se purificó por diálisis contra tampón de fosfato, pH 7,4. Los geles sintetizados se describen en la tabla 2 junto con sus propiedades reológicas.

Tabla 2: concentraciones de síntesis de hidrogel de ácido hialurónico-colágeno humano (I) y propiedades reológicas.

ID de la muestra	[AH] (mg/ml)	[Col(I)] (mg/ml)	G' (Pa)	G'' (Pa)
A*	3	3	199	24,6
B	12	6	1260	154
C	16	8	2450	288
D*	12	12	3160	420
E	24	12	5440	433
F*	12	3	1110	52,2
G*	16	3	1490	60,6
H*	20	3	1770	49,5

*Estos ejemplos no forman parte de la invención y se proporcionan solo con fines de información.

Ejemplo 9

Concentración de biopolímero de los materiales de relleno dérmico

Con el fin de determinar la concentración de biopolímero en geles, el peso del gel hidratado se comparó con el del gel seco. Se pesó una muestra de 2 ml de gel y se secó por congelación instantánea en nitrógeno líquido, seguida de liofilización a -50 °C y 0,02 Torr (2,66 Pa). Una solución del tampón apropiado también se pesó y se secó de la misma manera para tener en cuenta el contenido de sal del gel. El contenido total de sólidos del gel se calculó

dividiendo el peso seco por el volumen húmedo, suponiendo una densidad de 1 g/ml para el gel húmedo, para dar un valor en mg/ml. El contenido de sólidos de sal se restó, a continuación, de este valor para determinar la concentración de biopolímero en el gel.

5 Tabla 3: concentraciones finales de hidrogeles de ácido hialurónico-colágeno humano (I).

ID de la muestra	[AH](mg/ml)	[Col(I)] (mg/ml)	Concentración final (mg/ml)
A*	3	3	5,3
B	12	6	16,3
C	16	8	19,4
D*	12	12	22,6
E	24	12	31,6

*Estos ejemplos no forman parte de la invención y se proporcionan solo con fines de información.

Ejemplo 10

Relaciones de hinchamiento

10 Se determinaron las relaciones de hinchamiento respecto al contenido inicial de agua para los geles mediante el aumento de peso cuando se equilibraron con tampón de fosfato. Para cada gel, se inyectó aproximadamente 1 ml en un tubo Falcon de 15 ml y se pesó, seguido de la adición de 10 ml de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Los geles se mezclaron minuciosamente con el tampón y se agitaron con formación de vórtice durante 30 segundos. 15 Los geles se dejaron equilibrar en el tampón durante 48 horas a 4 °C. Después de este tiempo, las suspensiones se centrifugaron a 4000 RPM en un rotor de cubeta oscilante durante 5 minutos. El tampón sobrenadante se decantó a continuación y se midió el peso del gel hinchado. La relación de hinchamiento se determinó dividiendo el peso final del gel hinchado por el peso del gel inicial.

20 Tabla 4: relaciones de hinchamiento de hidrogeles de ácido hialurónico-colágeno humano (I).

ID de la muestra	[AH] (mg/ml)	[Col(I)] (mg/ml)	Relación de hinchamiento
A*	3	3	0,96
B	12	6	1,67
C	16	8	1,69
D*	12	12	1,49
E	24	12	1,65

*Estos ejemplos no forman parte de la invención y se proporcionan solo con fines de información.

Ejemplo 11

AH/Colágeno para defectos faciales de la mejilla

25 Este ejemplo ilustra el uso de composiciones y métodos desvelados en el presente documento para un trastorno facial.

30 Una mujer de 58 años se presentó con una cara delgada. Sentía que su rostro tenía un aspecto viejo, triste y amargado debido a la menor plenitud del contorno de sus mejillas. La evaluación preoperatoria de la persona incluye historial y examen físico rutinarios, además del consentimiento informado completo que desvela todos los riesgos y beneficios relevantes del procedimiento. El médico que evalúa a la individuo determina que ella es candidata para la administración de las composiciones y métodos de material de relleno dérmico desvelados en el presente documento.

35 Una composición de la invención, tal como se describe en el EJEMPLO 4, se proporciona en una jeringa de 20 ml. Se usan cánulas de infiltración romas de un orificio (3 mm de diámetro interno) para colocar aproximadamente 15 ml de la composición en la jeringa por vía subcutánea y bajo el sistema músculo aponeurótico superficial en las mejillas izquierda y derecha.

40 Se hace un seguimiento a la persona durante aproximadamente 7 días. El médico evalúa la zona de tratamiento y determina que el tratamiento tuvo éxito. Las mejillas de la mujer están más rellenas que antes del tratamiento. Tanto la mujer como su médico están satisfechos con los resultados del procedimiento porque parece más joven que cuando vino para recibir tratamiento.

Ejemplo 12

Tratamiento de defectos faciales de los párpados

50 Este ejemplo ilustra el uso de composiciones y métodos desvelados en el presente documento para un tratamiento de defectos del párpado.

Una mujer de 37 años se presentó con arrugas finas alrededor de los ojos y declara que sus ojos le hacían parecer vieja y enfadada. La evaluación preoperatoria de la persona incluye historial y examen físico rutinarios, además del consentimiento informado completo que revela todos los riesgos y beneficios relevantes del procedimiento. El médico que evalúa a la individuo determina que ella es candidata para la administración de las composiciones y métodos de material de relleno dérmico desvelados en el presente documento.

Una composición, elaborada tal como se describe en el ejemplo 5, se proporciona en una jeringa de 20 ml. Se inyectan aproximadamente 2,5 ml de la composición con una aguja fina por vía subcutánea en la piel debajo de las arrugas en las regiones adyacentes a los ojos.

Se hace un seguimiento a la persona durante aproximadamente 7 días. El médico evalúa el ojo de la paciente y determina que el tratamiento tuvo éxito. Tanto la mujer como su médico están satisfechos con los resultados del procedimiento porque sus ojos parecen renovados y la piel parece rejuvenecida. Aproximadamente un año después del procedimiento, la mujer indica que su calidad de vida ha mejorado.

Ejemplo 13

Tratamiento de cicatrices por acné

Este ejemplo ilustra el uso de composiciones y métodos desvelados en el presente documento para el tratamiento de cicatrices por acné.

Un hombre de 25 años presenta cicatrices por acné moderadas en la línea de la mandíbula, incluyendo depresiones y picaduras. Declara que no está satisfecho con su aspecto y siente que está socialmente inhibido debido a su percepción de su aspecto. La evaluación preoperatoria de la persona incluye historial y examen físico rutinarios, además del consentimiento informado completo que revela todos los riesgos y beneficios relevantes del procedimiento. El médico que evalúa al individuo determina que él es candidato para la administración de las composiciones y métodos de material de relleno dérmico desvelados en el presente documento.

Una composición, tal como la elaborada como se describe en el ejemplo 12, se proporciona en jeringas de 10 ml. El médico inyecta una pequeña cantidad de la composición debajo de la piel en cada zona deprimida o picada de la línea de la mandíbula del paciente para elevar la zona para que coincida con la piel circundante.

El individuo regresa para una visita de seguimiento con el médico en 14 días. El facultativo evalúa al paciente y determina que el tratamiento tuvo éxito. El hombre declara que está satisfecho con los resultados del método porque su piel tiene aspecto más liso y la cicatrización por acné es sustancialmente menos visible. Aproximadamente seis meses después del método, el hombre vuelve para un tratamiento de seguimiento. Declara al médico que su calidad de vida ha mejorado mucho desde el método y su aspecto ya no le genera timidez.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como el peso molecular, las condiciones de reacción y demás utilizados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretende obtener. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debería al menos interpretarse a la luz del número de dígitos significativos indicados y aplicando técnicas de redondeo habituales.

Los términos "un", "una", "el/la" y otros referentes similares utilizados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) han de interpretarse como que incluyen tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que de otro modo se contradiga claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o un lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento se limita a ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de ninguna reivindicación. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva ha de interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

Los agrupamientos de elementos o realizaciones alternativos desvelados en el presente documento no han de interpretarse como limitaciones. Cada miembro de un grupo se puede referir a y reivindicar individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos encontradas en el presente documento. Se prevé que uno o más miembros de un grupo se pueda incluir en, o eliminar de, un grupo por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se da cualquier inclusión o eliminación de este tipo, se considera que la memoria descriptiva debe contener el grupo como modificado para cumplir con la descripción escrita en todos los grupos Markush usados en las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento se describen determinadas realizaciones, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para realizar la invención. Por supuesto, variaciones en estas realizaciones se harán evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de la descripción anterior. El inventor espera que los expertos en la materia empleen variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de forma diferente a la específicamente descrita en el presente documento. En consecuencia, las reivindicaciones incluyen todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto expuesta en las reivindicaciones según lo permitido por la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas sus posibles variaciones está contemplada a menos que se indique lo contrario en el presente documento o de otro modo se contradiga claramente por el contexto.

En resumen, se ha de entender que las realizaciones desveladas en el presente documento son ilustrativas de los principios de las reivindicaciones. Otras modificaciones que puedan emplearse están en el ámbito de las reivindicaciones. Por tanto, a modo de ejemplo, pero no de limitación, pueden utilizarse realizaciones alternativas de acuerdo con los contenidos del presente documento. En consecuencia, las reivindicaciones no se limitan a las realizaciones precisamente como se muestran y se describen.

REIVINDICACIONES

1. Un producto estético de tejido blando que comprende:
 - 5 un material de relleno que comprende un hidrogel que tiene una forma adecuada para la inyección en tejido de mamífero; y
una etiqueta que comprende instrucciones para inyectar el material de relleno en el tejido;
en el que el hidrogel comprende agua, y una matriz macromolecular reticulada, que comprende:
 - 10 un componente de ácido hialurónico; y
un componente de colágeno;

en el que el componente de ácido hialurónico se reticula al componente de colágeno mediante un componente de reticulación;
15 en el que el componente de reticulación comprende una pluralidad de unidades de reticulación, en el que al menos una parte de las unidades de reticulación comprende un enlace éster o un enlace amida, y
en el que la relación en peso del componente de ácido hialurónico respecto al componente de colágeno en la matriz macromolecular reticulada es 2.
- 20 2. El producto de la reivindicación 1, en el que el componente de colágeno comprende colágeno de tipo I o colágeno de tipo III.
3. El producto de la reivindicación 1, en el que el hidrogel está en forma de un material de relleno dérmico.
- 25 4. El producto de la reivindicación 1, en el que el hidrogel está en forma de un material de relleno de labios.
5. Un método de mejora de una cualidad estética del tejido blando de un ser humano que comprende:
 - 30 inyectar una composición de hidrogel en un tejido blando del ser humano para mejorar de este modo la cualidad estética del tejido blando;
en el que la composición de hidrogel comprende agua, y una matriz macromolecular reticulada, que comprende:
 - 35 un componente de ácido hialurónico; y
un componente de colágeno;

en el que el componente de ácido hialurónico se reticula al componente de colágeno mediante un componente de reticulación; y
40 en el que el componente de reticulación comprende una pluralidad de unidades de reticulación, en el que al menos una parte de las unidades de reticulación comprende un enlace éster o un enlace amida, y
en el que la relación en peso del componente de ácido hialurónico respecto al componente de colágeno en la matriz macromolecular reticulada es 2.
- 45 6. El método de la reivindicación 5, en el que el componente de colágeno comprende colágeno de tipo I o colágeno de tipo III.
7. El método de la reivindicación 5, en el que el hidrogel está en forma de un material de relleno dérmico o un material de relleno de labios.
- 50 8. Un material de relleno dérmico, que comprende:
 - 55 un hidrogel que tiene una forma adecuada para la inyección en tejido de mamífero;
en el que el hidrogel comprende agua, y una matriz macromolecular reticulada que comprende:
 - un componente de ácido hialurónico; y
un componente de colágeno;

en el que el componente de ácido hialurónico se reticula al componente de colágeno mediante un componente de reticulación;
60 en el que el componente de reticulación comprende una pluralidad de unidades de reticulación, en el que al menos una parte de las unidades de reticulación comprende un enlace éster o un enlace amida, y
en el que la relación en peso del componente de ácido hialurónico respecto al componente de colágeno en la matriz macromolecular reticulada es 2.
- 65 9. El material de relleno dérmico de la reivindicación 8, en el que el componente de colágeno comprende colágeno de tipo I o colágeno de tipo III.

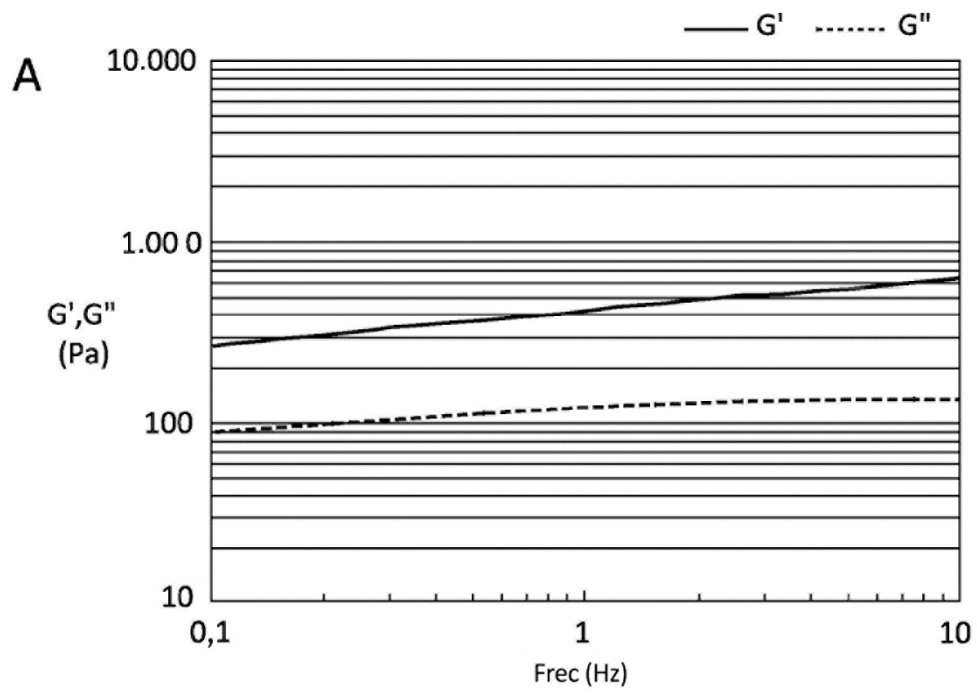


FIG. 1A

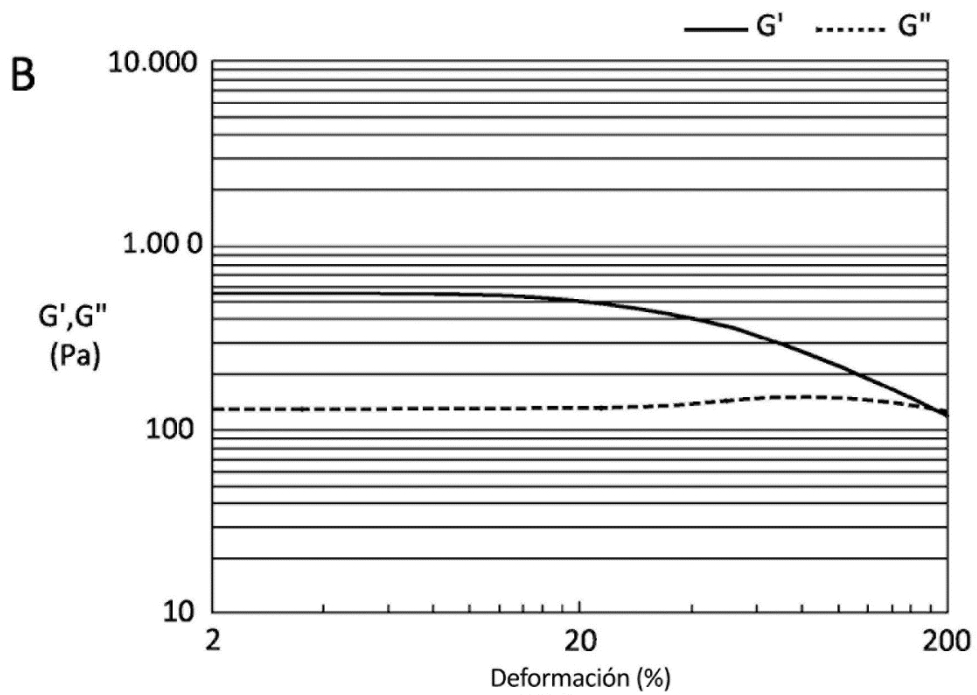


FIG. 1B

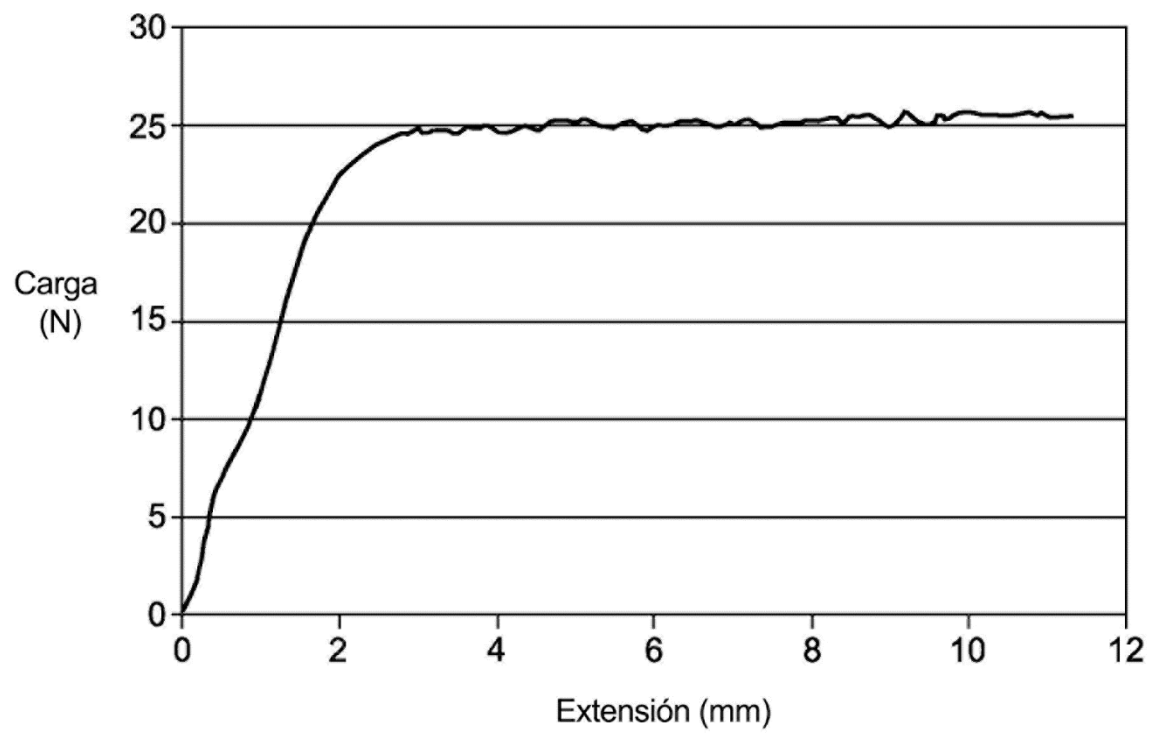


FIG. 2

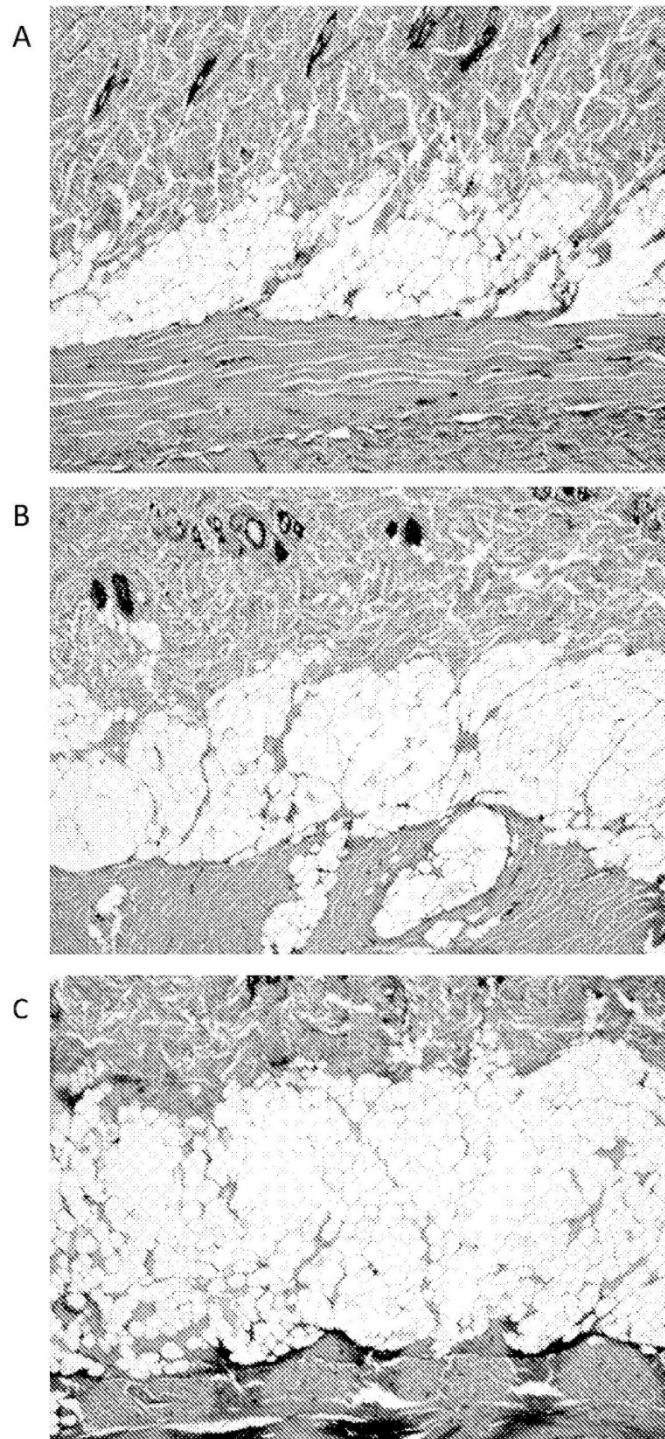


FIG. 3