

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 875**

51 Int. Cl.:

A61K 8/65	(2006.01)
A61Q 19/08	(2006.01)
A61K 8/34	(2006.01)
A61K 8/60	(2006.01)
A61K 8/44	(2006.01)
A61L 27/24	(2006.01)
A61L 27/34	(2006.01)
A61L 27/50	(2006.01)
C08L 89/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2014 PCT/US2014/020217**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14138021**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2014 E 14759906 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2964184**

54 Título: **Composición de colágeno polimerizable in situ inyectable**

30 Prioridad:

04.03.2013 US 201361851119 P

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

20.08.2018

73 Titular/es:

**DERMELLE, LLC D/B/A ETERNOGEN, LLC
(100.0%)
3610 Buttonwood Drive, Suite 200
Columbia, Missouri 65201, US**

72 Inventor/es:

**DEVORE, DALE, P.;
BROOKS, ROBERT, J. y
BYRNE, TODD**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 678 875 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de colágeno polimerizable in situ inyectable

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de las composiciones de colágeno y sus métodos de uso.

2. Descripción de la técnica relacionada

Las composiciones de colágeno se han utilizado durante más de 30 años para aumentar o suavizar los defectos de los tejidos blandos tales como las arrugas dérmicas y los pliegues dérmicos, para dar volumen a los surcos, o para corregir la falta de uniformidad y la laxitud del contorno dérmico.

10 Las composiciones de colágeno utilizadas para el aumento del tejido blando han estado compuestas de fibrillas de colágeno reconstituidas preparadas a partir de colágeno solubilizado extraído de pieles de animales, fibrillas de colágeno reconstituidas preparadas a partir de colágeno humano recombinante soluble o fibrillas de colágeno intactas o fibras procesadas a partir de piel humana. En todos los casos la composición de colágeno ha estado compuesta de fibrillas/fibras de colágeno o fibrillas/fibras de colágeno reticuladas.

15 Como los tejidos blandos se componen principalmente de matrices basadas en colágeno, tiene sentido corregir los defectos de los tejidos blandos con colágenos o composiciones basadas en colágeno. Ha habido al menos doce productos de colágeno aprobados por la FDA disponibles para el aumento de los tejidos blandos en Estados Unidos desde 1981. Estos productos se llaman generalmente rellenos dérmicos. Sin embargo, en este momento, la mayoría de los rellenos a base de colágeno ya no están disponibles en el mercado de Estados Unidos. Se han remplazado
20 por composiciones que proporcionan más durabilidad incluyendo productos de ácido hialurónico, y productos que contienen microperlas de hidroxilapatita, partículas de ácido poli-L-láctico, y microesferas de polimetilmetacrilato.

Todavía hay interés en tener composiciones mejoradas a base de colágeno disponibles para el aumento del tejido blando. Sin embargo, las composiciones deben mostrar mayor durabilidad.

25 Una solución de colágeno polimerizable *in situ* se describe en el documento de Patente US 3,949,073. Composiciones dermatológicas inyectables para el tratamiento de arrugas que comprenden EDTA se describen en el documento de Patente EP 2 033 689 A1. Composiciones de relleno termogelificantes inyectables a base de colágeno y una sal de poliol o azúcar se describen en el documento de Patente WO 02/40072 A2.

Breve compendio de la invención

30 En ciertas realizaciones, la invención se dirige a una composición de colágeno soluble en ácido inyectable que comprende, una solución neutralizada que comprende el colágeno soluble en ácido, EDTA y un poliol, en donde la composición es inyectable a pH neutralizado, y el colágeno soluble en ácido polimeriza después de la exposición a fluidos que contienen iones.

35 En ciertas realizaciones, la invención se dirige a un método para aumentar el tejido blando, que comprende inyectar en una deficiencia de tejido blando una composición de colágeno soluble en ácido que comprende, una solución neutralizada que comprende el colágeno soluble en ácido y EDTA, en donde la composición es inyectable a pH neutralizado y en donde el colágeno soluble en ácido polimeriza después de la exposición al tejido. En ciertas realizaciones de la invención, la composición inyectada produce la regeneración del tejido.

Breve descripción de los dibujos

40 Las Figuras 1a y 1b representan la polimerización de la composición de una realización de la presente invención en solución salina.

La Figura 2 representa implantes de la composición de una realización de la presente invención en dermis de rata a los 6 meses.

La Figura 3 representa un implante de la composición de una realización de la presente invención en dermis de rata a los 6 meses.

45 La Figura 4 representa un implante de la composición de una realización de la presente invención en dermis de rata a los 6 meses.

La Figura 5 representa una fotomicrografía TEM de una fibrilla de colágeno de una realización de la presente invención.

Descripción detallada de una realización preferida

La presente invención se refiere a una composición de colágeno única con aplicaciones para el aumento del tejido blando y la regeneración del tejido, entre otros usos. La presente invención se dirige a composiciones de colágeno inyectables solubles en ácido que comprenden una solución neutralizada de un colágeno soluble en ácido, EDTA y un poliol, en donde la composición es inyectable a pH fisiológico y el colágeno soluble en ácido polimeriza después de la exposición al tejido como se definió en la reivindicación 1.

En ciertas realizaciones, el inyectable, composiciones de colágeno solubles polimerizables *in situ* están en forma de soluciones transparentes, inyectables, viscosas a pH neutro. Las composiciones sufren rápidamente una polimerización que implica la gelificación inicial y la posterior fibrilación cuando se ponen en contacto o se mezclan con fluidos fisiológicos u otros fluidos que contienen iones para formar matrices fibrosas de colágeno.

Las composiciones de colágeno se tratan químicamente con EDTA para producir soluciones viscosas estables a temperatura a pH neutro que muestran características anti-colagenasa y antimicrobianas. Además, polioles, tales como D-manitol u otros potenciadores de la osmolalidad del poliol, se añaden preferiblemente para llevar la osmolalidad a niveles fisiológicos y ayudar a estabilizar la composición de colágeno soluble durante el almacenamiento. El D-manitol mejora también la biocompatibilidad. También se pueden añadir sacarosa, fructosa, y otros disacáridos para ayudar a estabilizar la composición durante el almacenamiento.

Las composiciones son adecuadas para su uso en el aumento del tejido blando y promueven la regeneración del tejido. Las características anti-colagenasas reducen o evitan la digestión por enzimas tisulares y las características antimicrobianas proporcionan una garantía adicional de esterilidad y prevención de la formación de biopelículas. Las composiciones son también útiles para recubrir implantes médicos.

La presente invención incluye además métodos para aumentar los tejidos blandos y la regeneración tisular utilizando composiciones de colágeno que polimeriza *in situ* de la presente invención. Las composiciones están preferiblemente en forma de un colágeno biocompatible, transparente, soluble, y viscoso a pH neutro que puede inyectarse fácilmente a través de agujas pequeñas (por ejemplo, calibre 27 o 30) y después de la inyección en los tejidos experimentan rápidamente gelificación y la posterior formación de fibrillas. Después de interactuar con los fluidos tisulares, la composición forma casi instantáneamente un gel transparente cohesivo que contiene unidades moleculares de colágeno que experimentan rápidamente la formación de fibrillas para formar una matriz de colágeno opaca. Además, la composición se ha tratado para incluir EDTA disódico en niveles suficientes para impartir actividad anti-colagenasa y bactericida. Se ha encontrado que la matriz de colágeno formada *in situ* muestra inesperadamente propiedades únicas que prolongan la durabilidad más allá de los rellenos de colágeno inyectables conocidos. El EDTA imparte actividad anti-colagenasa al inhibir las metaloproteinasas tisulares que digieren las matrices de colágeno y colágeno intersticial. También imparte actividad bactericida para proporcionar una composición adicional de esterilidad e inhibir potencialmente la formación de biopelículas.

Las composiciones de la presente invención han mostrado durabilidad y volumen de inyección retenido, con poca o ninguna reducción en el volumen de inyección original, durante periodos de tiempo de 4 semanas, 12 semanas y más allá de 6 meses. Esta propiedad es diferente de la mayoría de los geles de ácido hialurónico que aumentan en volumen tras la inyección y después pierden volumen gradualmente durante un periodo de meses. En ciertas realizaciones, tras la inyección en el tejido, tal como el tejido dérmico, la composición de colágeno que polimeriza *in situ* forma una masa fibrosa que se integra con las matrices de tejido circundantes.

Ciertos términos tienen los siguientes significados como se utilizan aquí:

Por "colágeno" se entiende todos los tipos de colágeno incluyendo los que se han procesado o modificado. El colágeno puede ser de origen humano o animal o puede producirse utilizando técnicas recombinantes. Como se utiliza aquí, el colágeno incluye colágenos purificados, así como diversos derivados de colágeno.

Por "tejido" se entiende una agregación de células especializadas similares en un organismo, preferiblemente mamífero, y, lo más preferiblemente humano, donde las células se exponen al fluido extracelular del organismo.

Por "polimerización *in situ*" se entiende la formación de un gel de colágeno cohesivo, y posteriormente una masa fibrilar de colágeno, tras la inyección del colágeno soluble en el tejido y no antes de la inyección.

Por "masa de gel" se entiende el gel transparente que se forma inmediatamente después de que la solución de colágeno viscosa se inyecta en una solución fisiológica o se inyecta en el tejido o se expone a iones que inician la polimerización. La masa de gel transparente se vuelve más opaca a medida que se convierte en una masa de colágeno fibrilar cohesivo minutos después de ponerse en contacto con los fluidos fisiológicos.

El colágeno utilizado para preparar el colágeno que polimeriza *in situ* se puede extraer de pieles de animales, tal como cuero bovino o cuero porcino, o puede ser colágeno humano derivado de células, o colágeno humano recombinante. Se prefiere que el colágeno base esté disponible en solución ácida. Se puede utilizar cualquier tipo de colágeno que forme fibrillas, soluble en ácido. Sin embargo, se prefieren para preparar la composición de colágeno que polimeriza *in situ*, los colágenos Tipo I y III.

En una realización de la presente invención, se utiliza un colágeno solubilizado en ácido, neutralizado, que permanece en solución a temperaturas fisiológicas, en el colágeno que polimeriza *in situ* de la presente invención. Un método para el tratamiento inicial del colágeno para formar dicha solución se describe en el documento de Patente U.S. Pat. No. 5,492,135.

5 En una realización, el colágeno soluble se puede aislar y purificar de fuentes animales que incluyen tejidos bovinos y porcinos o puede ser colágeno humano recombinante. La solución de colágeno ácida resultante preferiblemente se dializa extensamente contra soluciones de EDTA disódico para evitar la fibrillogénesis prematura del colágeno. Durante la diálisis escalonada, el pH de la solución de colágeno aumenta desde los niveles ácidos hasta un pH neutralizado mediante el ajuste del pH de las soluciones de diálisis de EDTA disódico utilizando hidróxido de sodio
10 1N. El pH neutralizado resultante está preferiblemente entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,5. A un pH neutralizado, la preparación de colágeno no experimenta una fibrillogénesis típica y permanece clara y transparente hasta que se pone en contacto con fluidos fisiológicos u otros fluidos que contienen iones.

El colágeno está presente en la composición de la presente invención en cantidades suficientes para inyectarse a través de agujas y cánulas de calibre 27-31 para proporcionar un volumen de tejido efectivo, pero no tan concentrado que no se pueda inyectar a través de agujas o cánulas de al menos calibre 27 o formar una matriz compacta que sea impermeable a las células huésped. En ciertas realizaciones, la composición comprende el colágeno soluble en ácido en una concentración entre 5 y 70 mg/ml (0,5-7,0% peso/volumen), entre 25 y 65 mg/ml (2,5-6,5% peso/volumen) o entre 20 y 40 mg/ml (2-5% peso/volumen).
15

El EDTA presente en la composición es preferiblemente EDTA disódico. El EDTA que permanece en la composición inyectable después de la diálisis está preferiblemente presente en una concentración suficiente para proporcionar la actividad anticolagenasa suficiente para inhibir la actividad de las metaloproteinasas tisulares y proporcionar actividad bactericida para asegurar la esterilidad e inhibir potencialmente la formación de biopelículas. En ciertas realizaciones, la concentración de EDTA en la composición inyectable está entre 10 y 50 mM, entre 25 mM y 40 mM, o entre 30 mM y 35 mM.
20

Las composiciones de la presente invención contienen un poliol para llevar la composición a la osmolalidad fisiológica y ayudar a estabilizar la composición de colágeno soluble durante el almacenamiento. El poliol puede también producir una mejor biocompatibilidad. La osmolalidad está preferiblemente entre 280 y 360 mmol/kg. En ciertas realizaciones, el poliol es un alcohol de azúcar u otro potenciador de la osmolalidad, y es preferiblemente D-manitol. En ciertas realizaciones, la composición comprende el poliol en una concentración entre 2,5% y 4%, o entre 3,0% y 3,9%, o 3,5%.
25 30

Disacáridos, tales como sacarosa o fructosa, se pueden incluir en la composición para ayudar a la estabilización de la solución de colágeno viscosa. En ciertas realizaciones, los disacáridos se añaden a una concentración final de entre 50 mM a 500 mM, o 100 mM a 400 mM.

La composición es una solución de pH neutralizado que permite la administración inyectable. En ciertas realizaciones, la viscosidad de la composición es la adecuada para la inyección a través de una aguja o cánula de calibre fino, tal como una aguja o cánula de calibre 27, 30 o 31. La baja viscosidad también permite fuerzas de baja extrusión. La composición se puede inyectar a través de agujas de calibre 27, 30 o 31 sin diferencia significativa en la fuerza de extrusión. Además de la facilidad de aplicación, la administración inyectable de la solución de colágeno permite el acceso a la zona de administración a la vez que se minimiza la lesión invasiva a los tejidos circundantes.
35

Tras la exposición a líquidos fisiológicos, tejidos, u otros fluidos que contienen iones, la solución de colágeno polimeriza. La composición se somete a una gelificación rápida, casi instantánea, seguida de una fibrillogénesis rápida para formar una matriz de fibrillas de colágeno. En ciertas realizaciones, la composición se polimeriza inicialmente en una masa de gel dentro de los 180 segundos después de la exposición al tejido, o dentro de entre 10 y 120 segundos o entre 10 y 60 segundos después de la exposición al tejido.
40

La composición forma una matriz de fibrillas de colágeno rápidamente después de la gelificación. En ciertas realizaciones, la matriz de colágeno es una masa opaca blanca que comprende fibrillas de colágeno intactas. En ciertas realizaciones, la composición forma una matriz de fibrillas de colágeno dentro de los 10 minutos después de la exposición al tejido, o dentro de los 5 minutos después de la exposición al tejido.
45

La viscosidad de la solución de colágeno es suficiente para llenar un defecto del tejido blando u otros sitios de administración específicos y permanecer en el sitio del tejido deseado hasta que se produzca la gelificación y la formación de fibrillas. Además, debido a la rápida gelificación y formación de la matriz, el volumen de la matriz de colágeno formada es equivalente al volumen inyectado, por lo que es conveniente para los profesionales hacer una determinación más precisa del volumen apropiado para tratar un defecto dérmico. Esta es una ventaja sobre la mayoría de los productos inyectables de hialurónico que aumentan en volumen después de la inyección.
50

La presente invención se refiere también a un método para aumentar el tejido blando o regenerar tejido. El método comprende inyectar una composición de colágeno soluble en ácido neutralizada como se define en la reivindicación 1, en una deficiencia de tejido blando, en donde el colágeno soluble en ácido polimeriza tras la exposición al tejido. Tras la inyección en el tejido y el contacto con el fluido tisular, la composición se somete a una gelificación rápida,
55

casi instantánea, que es seguida por una fibrillogénesis rápida para formar una matriz de fibrillas de colágeno. La matriz de fibrillas de colágeno llena la deficiencia de tejidos blandos. Como se utiliza aquí, el llenado no requiere que la deficiencia se llene completamente. Sin embargo, también se contempla que la deficiencia se llene por completo. La composición comprende EDTA en las concentraciones descritas anteriormente. La composición comprende polioles en las concentraciones descritas anteriormente. La composición polimeriza y forma una matriz de fibrillas de colágeno durante los periodos de tiempo discutidos anteriormente.

El método de aumento de tejido blando se puede utilizar con una variedad de deficiencias de tejido blando. Los defectos de los tejidos blandos que se pueden tratar con el método de la invención incluyen arrugas, pliegues dérmicos, laxitud dérmica, defectos del contorno de la piel, líneas finas dérmicas, surcos dérmicos y desigualdades dérmicas. La composición se puede inyectar en una variedad de áreas dérmicas. El método es particularmente muy adecuado para inyectarse en una deficiencia de los tejidos blandos de los labios o la piel facial. La cantidad de la composición que se va a inyectar puede ser determinada por un experto en la técnica en base a la deficiencia de tejido blando que se va a tratar. En muchas aplicaciones, se pueden utilizar volúmenes de 0,1-0,5 mL.

El método de la presente invención proporciona una matriz de colágeno *in situ* que es sorprendentemente duradera. Cuando se utiliza aquí, una matriz se mantiene duradera si la matriz de colágeno no se degrada a un nivel visualmente perceptible. Duradera en este contexto significa que la matriz permanece intacta y mantiene suficientemente su volumen de inyección para proporcionar efectividad clínica a largo plazo. El método de la presente invención puede producir una matriz de fibrillas de colágeno que permanece duradera durante al menos 4 semanas después de dicha inyección, al menos 12 semanas e incluso 6 meses o más. En ciertas realizaciones, la matriz de colágeno producida por el método de la presente invención se integra con el tejido circundante, preferiblemente por integración con las matrices del tejido circundante.

La composición de la reivindicación 1 se puede utilizar también para promover o mejorar la regeneración del tejido blando. La matriz de colágeno formada por la composición de la presente invención proporciona un marco o matriz biológica que soporta y/o estimula la revascularización y población celular. Esto apoya la remodelación del tejido propio del sujeto.

La presente invención proporciona una serie de ventajas sobre otras composiciones basadas en colágeno para el aumento de tejidos blandos. Por ejemplo, las composiciones de colágeno descritas aquí son biocompatibles, biodegradables, y estables en solución a pH neutro. La composición se caracteriza por la formulación *in situ* de una matriz de colágeno, a diferencia de otras composiciones basadas en colágeno que polimerizan antes de la implantación. La presente invención no requiere el uso de agentes reticulantes, componentes fibrilares adicionales, o polímeros sintéticos. La capacidad de manipular químicamente el colágeno para formar una solución estable a pH neutro permite la administración inyectable a través de una aguja de calibre fino. Además de la facilidad de aplicación, la administración inyectable de la solución de colágeno permite el acceso a los sitios de administración a la vez que minimiza la lesión invasiva a los tejidos circundantes. La viscosidad de la solución de colágeno es suficiente para llenar un defecto del tejido blando u otros sitios de administración específicos y permanecer en el sitio del tejido deseado hasta que se produce la gelificación y la formación de fibrillas. El volumen de la matriz de colágeno formada es equivalente al volumen inyectado por lo que es conveniente para los profesionales hacer una determinación más precisa del volumen apropiado para tratar un defecto dérmico. Esta es una ventaja sobre la mayoría de los productos inyectables de hialuronano que aumentan en volumen después de la inyección. La adición de EDTA disódico proporciona actividad anti-colagenasa para inhibir las colagenasas tisulares y otras metaloproteinasas para prolongar la durabilidad del implante de colágeno y la actividad bactericida para proporcionar esterilidad de la composición y evitar la posible formación de biopelícula. La adición de D-manitol, o alcoholes de azúcar similares, llevan la composición a osmolalidad fisiológica y ayuda a estabilizar la composición antes de la inyección en los tejidos o aplicación como un recubrimiento. Los estudios *in vivo* en modelos animales han demostrado el mantenimiento del aumento de tejido blando durante al menos 6 meses. Las composiciones preparadas asépticamente con EDTA disódico generalmente han demostrado ser estériles. Las contribuciones de EDTA disódico pueden haber contribuido a la capacidad para proporcionar composiciones estériles. Además, la composición ha mostrado la capacidad de promover la regeneración tisular sin utilizar agentes terapéuticos, células madre u otros estimuladores de crecimiento añadidos.

Ciertos aspectos de la presente invención se ilustran mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Los ejemplos 1-4 y 8-13 se incluyen con fines ilustrativos y no están de acuerdo con la invención.

Ejemplo 1

Preparación de composiciones de colágeno que polimerizan *in situ* por diálisis contra una solución única de EDTA a pH secuencialmente ajustado

Las composiciones de colágeno que polimerizan *in situ* se prepararon utilizando métodos basados en los descritos por DeVore y Eiferman (documento de Patente US Patent 5,492,135). Colágeno de bovino de Tipo I puro, soluble se adquirió de Advanced BioMatrix, Inc. Cloruro de sodio se añadió a la solución de colágeno soluble digerida con pepsina (3 mg/ml) a una concentración de 0,8 M para precipitar el colágeno. El precipitado opaco, blanco se

recuperó por centrifugación durante 30 minutos a 3.500 RPM y se concentró a aproximadamente 40 mg/mL colocándolo sobre el papel de filtro para absorber el exceso de líquido. El precipitado de colágeno concentrado se colocó en un tubo de diálisis con un límite de peso molecular de 100.000 daltons y se dializó contra ácido acético 0,5 M durante al menos 16-18 horas y luego contra ácido acético 0,1 M durante al menos 16-18 horas. El concentrado de colágeno transparente, viscoso y redisolto resultante se dializó a continuación contra EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica dihidrato, SigmaUltra-99%) 0,035 M (35 mM). Era importante dializar contra concentraciones de EDTA disódico de al menos 25 mM y preferiblemente tan altas como 35 mM. La diálisis se continuó durante 5 días con ajuste diario del pH desde el pH inicial de 4,5 a un pH final de 7,5. El concentrado de colágeno transparente y viscoso se recogió y se centrifugó para eliminar las burbujas de aire. El colágeno transparente, viscoso final mostró un pH de 7,4 y no experimentó la formación de fibrillas a temperatura ambiente. La fibrillogénesis del colágeno no se desencadenó hasta que el colágeno se expuso a líquidos fisiológicos o líquidos que contienen iones para desencadenar reacciones de gelificación y polimerización.

Evaluación de la gelificación y formación de fibrillas.

Alícuotas del colágeno que polimeriza *in situ* preparado como se describió anteriormente en este Ejemplo 1 se inyectaron en cloruro de sodio 0,8 M a 37°C, como se representa en la Figura 1a. Se observaron muestras de ensayo para la aparición del gel y colágeno fibroso. Como se muestra en la Figura 1b la solución de colágeno viscosa transparente formó una matriz de colágeno opaca, blanca en menos de 60 segundos.

Ejemplo 2

Evaluación de una biopsia de piel humana

Aproximadamente 0,2 cc de colágeno que polimeriza *in situ* preparado como se describió en el Ejemplo 1 se inyectó en la dermis de la mano. Se retiró una biopsia a las 4 semanas y se procesó para la tinción H & E. Evaluaciones histológicas muestran una biocompatibilidad excepcional con reactividad inflamatoria insignificante e integración clara por los fibroblastos del huésped.

Ejemplo 3

Evaluación de la inyección de colágeno que polimeriza *in situ* en tejidos de ratas.

El colágeno bovino soluble, digerido con pepsina, se adquirió de Advanced Biomatrix. El colágeno que polimeriza *in situ* se preparó como se describió en el Ejemplo 1 mediante diálisis extensiva del colágeno tratado con ácido, concentrado y precipitado con sal, contra EDTA 35 mM con un aumento escalonado del pH a 7,5. La concentración de colágeno fue 37 mg/mL según se analizó mediante análisis de hidroxiprolina. Las ratas se inyectaron en 4 sitios dérmicos con 0,4 cc de colágeno que polimeriza *in situ* en cada. Los sitios de inyección se examinaron para eritema y edema diariamente durante 1 semana, y después semanalmente durante 6 meses. Los animales se terminaron a las 2 semanas, 1 mes, 3 meses, y 6 meses. La piel de la rata se eliminó y los sitios de implante se examinaron macroscópicamente y se fotografiaron antes de la disección y la preparación para la evaluación histológica. Las secciones se tiñeron con H & E y se tomaron fotomicrografías para su evaluación. La evaluación del lado inferior de la dermis de la rata mostró claramente los sitios de implante de colágeno opacos a cada periodo de tiempo (Figura 2). El implante de colágeno se observó claramente en las secciones teñidas con H & E a cada periodo de tiempo con pocos cambios en el volumen de implante. La reactividad celular inflamatoria fue de insignificante a mínima y el propio implante estaba compuesto de una estructura colagenosa organizada con infiltrados celulares fibroblásticos (Figuras 3 y 4).

Ejemplo 4

Preparación de composiciones de colágeno que polimeriza *in situ* por diálisis contra múltiples soluciones de EDTA con pH ajustado.

El colágeno porcino de Tipo I puro, soluble se adquirió de SunMax Biotechnology, LTD. Una solución de cloruro de sodio saturada se añadió a la solución de colágeno soluble digerida con pepsina (3 mg/mL) a una concentración de 0,8 M para precipitar el colágeno. El precipitado blanco y opaco se recuperó por centrifugación durante 15 minutos a 5.000 RPM. El precipitado de colágeno concentrado se colocó en un tubo de diálisis con un límite de peso molecular de 10.000 daltons, o en un casete de diálisis con un límite de peso molecular de 20.000 daltons, y se dializó contra ácido acético 0,5 M durante al menos 16-18 horas y después contra ácido acético 0,1 M durante al menos 16-18 horas. El concentrado de colágeno transparente, viscoso y redisolto resultante se dializó después contra EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica dihidrato, SigmaUltra, ~99%) 0,035 M (35 mM). Era importante dializar contra concentraciones de EDTA disódico de al menos 25 mM y preferiblemente tan altas como 35 mM. El pH inicial fue $5,0 \pm 0,2$. La diálisis se continuó durante al menos 12 horas. El tubo o casete de diálisis se transfirió después a una cámara de diálisis que contenía EDTA 35 mM a un pH de $5,5 \pm 0,2$ y se dializó durante al menos 12 horas. El tubo o casete de diálisis se transfirió otra vez a una cámara de diálisis que contenía EDTA 35 mM a un pH de 6,0 y se dializó durante al menos 12 horas. Las etapas de diálisis posteriores contra EDTA 35 mM a pH 6,5 y 7,2 se llevaron a cabo para llevar el pH del colágeno final a aproximadamente 7,0. El colágeno transparente y viscoso final mostró un pH de aproximadamente 7,1 y no experimentó la formación de fibrillas a temperatura ambiente. La

fibrillogénesis del colágeno no se desencadenó hasta que se expuso el colágeno a líquidos fisiológicos o líquidos que contienen iones para desencadenar las reacciones de gelificación y polimerización.

Ejemplo 5

Efectos del D-manitol en la estabilidad del colágeno polimerizable *in situ*

5 Las soluciones de colágeno preparadas como se describió en el Ejemplo 4 se sometieron a una etapa de diálisis final contra EDTA 35 mM que contenía 3,8% de D-manitol (346 mmol/Kg). La estabilidad (mantenimiento de la claridad y transparencia) de las soluciones de colágeno que contenían D-manitol se comparó con las soluciones de colágeno sin D-manitol al incubar las soluciones a 36°C. La estabilidad se evaluó observando la apariencia visual de las soluciones de colágeno hasta 225 minutos. Los resultados demostraron que el D-manitol extendía significativamente la estabilidad de las soluciones de colágeno (al menos 225 minutos) en comparación con los controles (75 minutos).

Ejemplo 6

Mejora de los valores de irritación intracutánea con colágeno polimerizable *in situ* que contiene D-manitol

15 El ensayo de irritación intracutánea en conejos basado en la ISO 10993-10 se realizó en NASMA. Las muestras de ensayo incluían colágeno polimerizable *in situ* preparado como se describió en los Ejemplos 4 y 5, excepto que el proceso del Ejemplo 5 incluía una etapa de diálisis final contra D-manitol al 3,5%. Una dosis de 0,1 ml de las muestras de ensayo se inyectó por vía intracutánea en cinco sitios separados en las espaldas de 3 animales para cada composición. También se analizaron muestras positivas adicionales de control y controles negativos. Los sitios de inyección se examinaron para eritema y edema inmediatamente después de la inyección y a 24, 48 y 72 horas después de la inyección. Las observaciones continuaron a intervalos de 24 horas durante hasta 7 días después de la inyección. Los valores de los ensayos para la solución de colágeno polimerizable *in situ* sin D-manitol fueron similares a la muestra de control positivo. Sin embargo, los valores de los ensayos del colágeno polimerizable *in situ* con D-manitol fueron más bajos que los valores de los ensayos sin D-manitol; 0,7 para composiciones con D-manitol en comparación con 1,4 para composiciones sin D-manitol, en base a la escala de calificación en el protocolo de estudio NASMA. Estos resultados fueron inesperados e indican que la adición de D-manitol mejora la biocompatibilidad de las composiciones polimerizables *in situ*.

Ejemplo 7

Efecto de la sacarosa en la estabilización de las soluciones de colágeno que polimeriza *in situ*

30 Las soluciones de colágeno preparadas como se describió en el Ejemplo 4 se sometieron a una etapa de diálisis final contra EDTA 35 mM que contenía 3,5% de D-manitol y sacarosa 100 mM. Esta composición se comparó con la solución de colágeno sometida a la etapa final de diálisis contra D-manitol en el Ejemplo 5. La estabilidad de la solución (tiempo que las soluciones permanecen claras y transparentes) a 37°C se evaluó observando la apariencia visual de las soluciones de colágeno. Las soluciones dializadas contra D-manitol al 3,5% y sacarosa 100 mM mostraron un aumento significativo en la estabilidad en comparación con las soluciones dializadas contra D-manitol solo. En un ensayo de estabilidad, las soluciones dializadas contra D-manitol al 3,5% y sacarosa 100 mM mostraron un aumento de 4 veces en la estabilidad en comparación con las soluciones dializadas contra D-manitol. Esta observación sugiere que la estabilidad a largo plazo a temperatura ambiente (20-25°C) del colágeno polimerizable *in situ* se mejorará significativamente mediante la inclusión de sacarosa.

Ejemplo 8

40 Evaluación del colágeno que polimeriza *in situ* en tejidos intradérmicos de conejo

Bajo anestesia general, se implantaron tres ratas Sprague-Dawley con una muestra de colágeno bovino Monomero (RPC bovino) preparado de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 4 y un artículo de control (Restylane) mediante una inyección intradérmica profunda. Las inyecciones se colocaron a -2 cm de distancia a lo largo del eje vertebral con tres sitios en cada lado (6 en total incluyendo otras muestras de ensayo) por animal. Los artículos de ensayo y control se inyectaron en las localizaciones de dosificación designadas a un volumen de 0,15-0,25 mL por sitio.

Las observaciones clínicas y la valoración de la piel (eritema y edema) se realizaron inmediatamente después de la inyección y antes de la terminación, después de lo cual un animal designado se sacrificó a las 2, 5 y 8 semanas respectivamente. Se realizaron observaciones diarias durante la duración del estudio. Después de la terminación, los sitios de implantes y los ganglios linfáticos de drenaje (si se identificaron) se recogieron, se evaluaron groseramente para la irritación y se enviaron para histopatología.

En general, la inyección de colágeno que polimeriza *in situ* en el modelo de oreja de conejo dio como resultado irritación e inflamación de mínima a leve. Las respuestas tisulares fueron equivalentes a las respuestas tisulares al control.

Ejemplo 9

Evaluación del colágeno que polimeriza *in situ* en conejo para la respuesta tisular local

5 La solución de colágeno de porcino que polimeriza *in situ* preparada como se describió en el Ejemplo 4 se inyectó en el tejido subcutáneo del conejo y se evaluó la respuesta tisular local de acuerdo con la ISO 10993 6, Evaluación biológica de dispositivos médicos – Parte 6: Ensayos para los efectos locales después de la implantación.

10 La solución de colágeno porcino que polimeriza *in situ*, un artículo de control proporcionado por el patrocinador y un artículo de control negativo, junto con marcadores de localización, se implantaron por vía subcutánea y tres animales (por intervalo) se sacrificaron a las 4 semanas y 12 semanas. Los tejidos subcutáneos se extirparon y los sitios de implantación se examinaron macroscópicamente. Se realizó una evaluación microscópica de los sitios de implantación representativos de cada animal para definir mejor cualquier respuesta tisular.

15 La reacción macroscópica no fue significativa en comparación con el control proporcionado por el patrocinador y los artículos de control negativo a las 4 y 12 semanas. Microscópicamente, el artículo de ensayo permaneció intacto y se clasificó como no irritante en comparación con el control proporcionado por el patrocinador y los artículos de control negativo a las 4 y 12 semanas. El análisis microscópico adicional de las muestras de ensayo demostró el mantenimiento del volumen de 4 a 12 semanas y la integración con los tejidos circundantes.

20 Las observaciones clínicas y los resultados histológicos presentados en los Ejemplos 2, 3, 6, 8, y 9 demostraron la excepcional biocompatibilidad y la durabilidad *in vivo* del nuevo colágeno que polimeriza *in situ* de la composición de colágeno que polimeriza *in situ*. La durabilidad a 6 meses mostrada en el Ejemplo 3 excede la reportada clínicamente para la mayoría de las composiciones inyectables basadas en colágeno para el aumento de tejido blando.

Ejemplo 10

Microscopía electrónica de transmisión del colágeno que polimeriza *in situ* polimerizado

25 Protocolo de polimerización: Aproximadamente 0,1 ml de colágeno que polimeriza *in situ* preparado como en el Ejemplo 4 se añadieron a 1 ml de 2X solución salina tamponada de fosfato a pH 7,2 a 35°C en un tubo de microcentrífuga. Después de 8-10 minutos, las muestras de colágeno polimerizado se pipetearon (una gota) en una mini-rejilla (-2 mm de diámetro) en el laboratorio de preparación de TEM. Después el exceso se eliminó para crear una película delgada. Se añadió un agente de contraste para análisis de TEM. Las fotomicrografías TEM mostraron fibrillas de colágeno intactas bien unidas (Figura 5).

Ejemplo 11

30 Demostración de la actividad anti-colagenasa

35 Este estudio se realizó para determinar la inhibición de colagenasa de las composiciones de colágeno polimerizable *in situ*. Las fibrillas de colágeno puro sirvieron como un artículo de control y la solución de colágeno de ensayo preparada como se describió en el Ejemplo 4 se polimerizó antes del ensayo para imitar una condición similar *in vivo*. Los ensayos de hidroxiprolina se llevaron a cabo antes de la degradación de la colagenasa para asegurar que se utiliza la misma cantidad de colágeno en el estudio. Un ensayo de hidroxiprolina se llevó a cabo después de la degradación de la colagenasa para medir el residuo de colágeno después de la reacción.

Los resultados mostraron que el colágeno de ensayo que contiene EDTA 35 mM fue aproximadamente un 35% más resistente a la digestión con colagenasa en comparación con una muestra de colágeno estándar.

Ejemplo 12

40 Demostración de la actividad bactericida

45 Este estudio se llevó a cabo para evaluar la actividad bactericida de las composiciones de colágeno polimerizable *in situ*. Dos muestras de ensayo de colágeno polimerizable *in situ*, Lot 0022, preparado como se describió en el Ejemplo 4, se expusieron a *Staphylococcus aureus*. Las muestras de ensayo se polimerizaron para formar un armazón antes del ensayo para imitar una condición similar *in vivo*. Los efectos antimicrobianos se evaluaron mediante imagen SEM. Las muestras se expusieron a la solución de bacterias (-100CFU/mL) durante 2 días. Los armazones de colágeno se eliminaron de las soluciones de bacterias, se enjuagaron en 1X solución salina tamponada de fosfato y se trataron con solución fijadora (2% de paraformaldehído y 2% de glutaraldehído en tampón de cacodilato 0,1M) y se enjuagaron con agua pura antes de la toma de imágenes. Las fotomicrografías SEM demostraron claramente la ausencia de colonias de bacterias.

50 Ejemplo 13

Uso de una solución de colágeno que polimeriza *in situ* como recubrimiento

Cinco materiales diferentes se recubrieron con una solución de colágeno que polimeriza *in situ*.

1. Placas de acero inoxidable (lisas y rugosas en la superficie utilizando papel de lija de 50 y 220).
2. Tornillo de interferencia de titanio.
3. Sutura de polipropileno (Prolene).
- 5 4. Malla de polipropileno (peso ligero, Bard).
5. Tornillo de interferencia PEEK (poliéter éter cetona) (Smith and Nephew).

El colágeno soluble, viscoso dio como resultado un recubrimiento espeso en todos los materiales. Las muestras se colocaron en placas Petri para polimerizar y secar. Después de secarse los recubrimientos eran muy delgados, transparentes, y muy difíciles de ver en algunas muestras de material.

10 Las películas se caracterizaron utilizando al menos uno de los siguientes métodos:

1. Microscopía de campo claro – Se utilizó un microscopio invertido de Nikon para capturar el recubrimiento transparente del RPC. Las imágenes de microscopía proporcionaron medidas de los espesores de los recubrimientos.
2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) – La imagen SEM (electrón secundario) se utilizó para investigar la integridad y la calidad de los recubrimientos.
- 15 3. Espectroscopía FTIR – Se adquirieron escaneos de los materiales poliméricos anteriores y posteriores para determinar la presencia del recubrimiento del colágeno.
4. Analizador de forma de gota – La energía superficial de las placas metálicas se determinó antes y después del recubrimiento para determinar los cambios en el ángulo de contacto/energía superficial.
- 20 5. Ensayo de estabilidad – Después de la polimerización de los recubrimientos, los materiales recubiertos se colocaron después en PBS y se incubaron durante 30 días a 37°C para determinar la estabilidad del recubrimiento. Después de 30 días, los materiales se eliminaron y se llevó a cabo una microscopía de campo claro para determinar la estabilidad y espesor del recubrimiento.

25 Los resultados mostraron la presencia de un recubrimiento de colágeno liso y conforme en suturas de polímeros y mallas de polímeros. De igual forma, las placas de acero inoxidable pulidas se recubrieron eficazmente con una solución de colágeno que polimeriza *in situ*. En general, la composición de colágeno que polimeriza *in situ* se polimerizó y adhirió a ambos materiales poliméricos y metálicos y fue estable después de 30 días de exposición a una solución salina tamponada de fosfato a 37°C.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de colágeno soluble en ácido inyectable que comprende, una solución neutralizada que comprende el colágeno soluble en ácido, EDTA y un poliol, en donde dicha composición es inyectable a pH neutralizado, y
- 5 en donde dicho colágeno soluble en ácido sufre fibrillogénesis tras la exposición a fluidos que contienen iones para formar una matriz de fibrillas de colágeno opaca.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende dicho colágeno soluble en ácido en una concentración entre 5 y 70 mg/ml, preferiblemente entre 25 y 65 mg/ml, y más preferiblemente entre 20 y 40 mg/ml.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1, en donde dicho EDTA es EDTA disódico.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende dicho EDTA en una concentración entre 10 y 50 mM, preferiblemente entre 25 y 40 mM, y más preferiblemente entre 30 y 35 mM.
5. La composición de la reivindicación 1, en donde dicho poliol es un alcohol de azúcar, y preferiblemente D-manitol.
- 15 6. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición comprende dicho poliol en una concentración entre 2,5% y 4%, y preferiblemente entre 3,0% y 3,9%.
7. La composición de la reivindicación 1, que comprende además una fructosa o un disacárido, preferiblemente sacarosa.
- 20 8. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición es inyectable a través de agujas o cánulas de calibre 27.
9. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición polimeriza en una masa de gel dentro de los 10 a 120 segundos después de la exposición a dicho tejido, y preferiblemente dentro de los 10 a 60 segundos después de la exposición a dicho tejido.
- 25 10. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición forma una matriz de fibrillas de colágeno dentro de los 10 minutos después de la exposición a dicho tejido, y preferiblemente dentro de los 5 minutos después de la exposición a dicho tejido.
11. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición tiene una osmolalidad de 280 – 360 mmol/kg.
- 30 12. Un método no terapéutico para aumentar el tejido blando que comprende inyectar en una deficiencia de tejido blando, preferiblemente en donde la deficiencia de tejido blando es en los labios o piel facial, una composición de acuerdo con la reivindicación 1.
13. El método no terapéutico de la reivindicación 12, en donde dicha deficiencia de tejido blando se selecciona del grupo que consiste en arrugas, pliegues dérmicos, laxitud dérmica, defectos del contorno de la piel, líneas finas dérmicas, surcos dérmicos y desigualdades dérmicas.
- 35 14. El método no terapéutico de la reivindicación 12, en donde dicho colágeno soluble en ácido forma una matriz de fibrillas de colágeno después de la exposición al tejido y la matriz permanece duradera durante al menos 4 semanas después de dicha inyección, preferiblemente durante al menos 12 semanas después de dicha inyección, y más preferiblemente durante al menos 6 meses.
- 40 15. El método no terapéutico de la reivindicación 12, en donde dicha composición inyectable produce la regeneración del tejido, se integra con las matrices del tejido o forma una matriz de fibrillas de colágeno que llena la deficiencia de tejido blando.

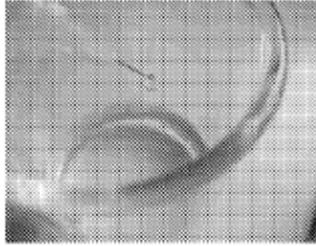


Fig 1a

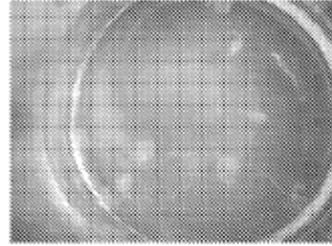


Fig 1b

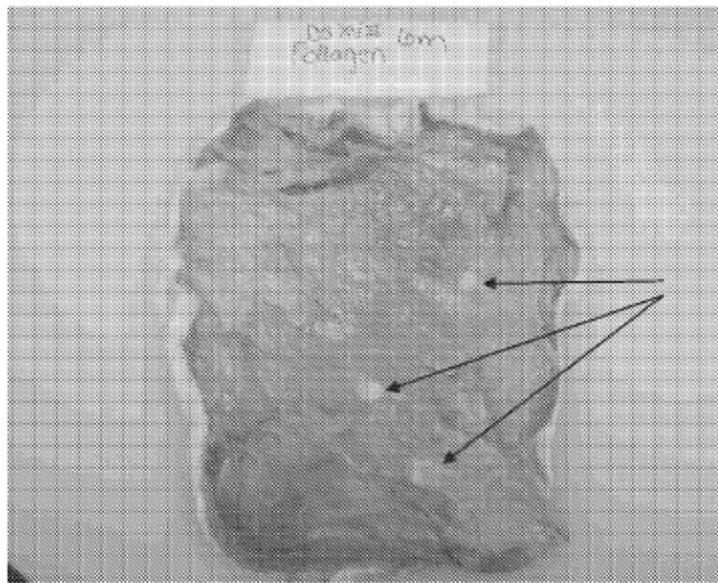


Fig 2

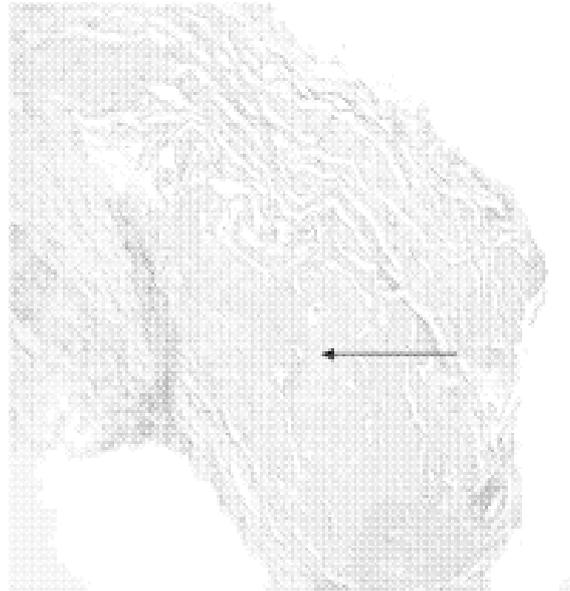


Fig. 3

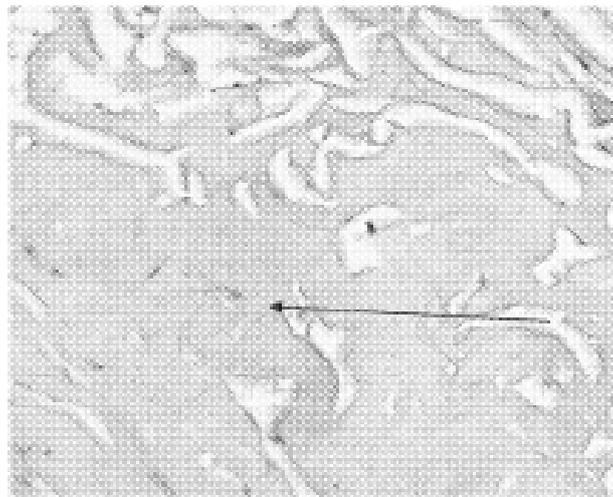


Fig. 4

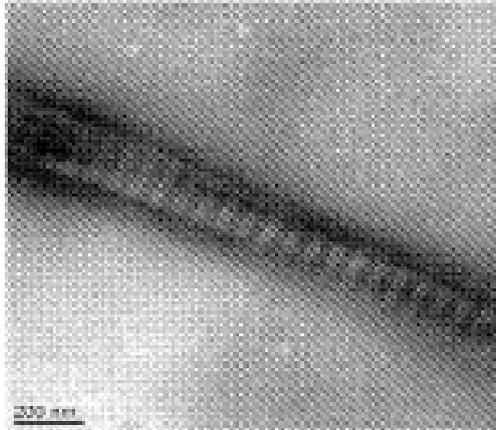


Fig. 5