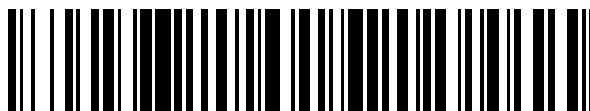


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 282**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 9/70</b>	(2006.01) <b>A61K 47/36</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/65</b>	(2006.01) <b>A61K 47/42</b>	(2007.01)
<b>A61K 8/73</b>	(2006.01)	
<b>A61K 38/39</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/727</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/728</b>	(2006.01)	
<b>A61K 33/38</b>	(2006.01)	
<b>A61K 9/06</b>	(2006.01)	
<b>A61K 47/02</b>	(2006.01)	
<b>A61Q 19/08</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2014 PCT/IB2014/061816**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14191955**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2014 E 14736979 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 3003379**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden colágeno y hialuronato de sodio.**

30 Prioridad:

**30.05.2013 IT MI20130883**

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

**14.01.2019**

73 Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (50.0%)  
Via Ponte della Fabbrica 3/A  
35031 Abano Terme (PD), IT y  
EURORESEARCH S.R.L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GENNARI, GIOVANNI;  
PANFILO, SUSI y  
SCALESCIANI, JUAN, FRANCISCO**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

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

ES 2 696 282 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**

Composiciones farmacéuticas que comprenden colágeno y hialuronato de sodio.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden colágeno e hialuronato de sodio, y opcionalmente plata, en forma de una almohadilla, que es útil en el tratamiento de lesiones cutáneas.

La invención también se refiere al procedimiento de preparación de las composiciones en forma de almohadilla.

Arte previo

10 El ácido hialurónico (HA) es uno de los polímeros más ampliamente usados en el campo de los apósitos para heridas y lesiones en general; es un heteropolisacárido que consiste en residuos alternos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina.

Es un polímero de cadena lineal con un peso molecular que varía entre 50,000 y  $13 \times 10^6$  Da, dependiendo de la fuente de la cual se obtiene y de los métodos de preparación usados.

15 Está presente en la naturaleza en geles pericelulares, en la sustancia fundamental del tejido conectivo de los vertebrados (de los cuales es uno de los constituyentes principales), en el líquido sinovial de las articulaciones, el humor vítreo y el cordón umbilical.

El HA desempeña un papel central en muchos tejidos conectivos, controlando su contenido de agua y funciones mecánicas.

Por lo tanto, el HA desempeña una parte importante en el organismo biológico, especialmente como soporte mecánico para las células de muchos tejidos, tal como la piel, los tendones, los músculos y el cartílago.

20 También se sabe que el HA, a través de su receptor de membrana CD44, modula muchos procedimientos diferentes relacionados con la fisiología celular y la biología, tal como la proliferación celular, la migración, la diferenciación y la angiogénesis, y también realiza otras funciones tales como la hidratación de los tejidos y la lubricación de las articulaciones.

25 Se ha demostrado que el HA desempeña un papel crucial en el procedimiento de reparación del tejido tanto en términos estructurales (en la organización de la matriz extracelular y la regulación de su hidratación) y como una sustancia que estimula una amplia gama de procedimientos en los que se involucra directa e indirectamente (formación de coágulos, actividad fagocítica, proliferación de fibroblastos, neovascularización, reepitelización, etc.) (Weigel P. et al., J Theoretical Biol, 1986:219-234; Abatangelo G. et al., J Surg Res, 1983, 35:410-416; Goa K. et al., Drugs, 1994, 47:536-566).

30 Estas propiedades bien reconocidas se han explotado durante mucho tiempo para preparar apósitos usados para el cuidado de heridas, úlceras y lesiones cutáneas de diversos orígenes, y en todas las lesiones de la piel que se benefician de la reepitelización acelerada.

35 Los apósitos a base de colágeno, una proteína fibrosa altamente característica que pertenece al grupo de la escleroproteína y está presente en grandes cantidades en organismos multicelulares como el constituyente fundamental de tejidos como tendones, piel, cartílago, hueso y muchos otros, ya son conocidos por el estado de la técnica. La proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 285 kDa. Su síntesis en la célula se caracteriza por la formación de tres cadenas de aminoácidos enrolladas juntas para formar un superhelix; fuera de la célula, las cadenas se ensamblan en estructuras rígidas de polímeros conocidas como fibrillas y fibras, que les dan a los tejidos características de elasticidad, resistencia y dureza. CN20121030943 describe métodos para producir compuestos de ácido hialurónico-colágeno. El colágeno generalmente usado es de origen bovino.

40 Finalmente, la plata se usa a menudo en composiciones tópicas debido a su acción antibacteriana, que se desarrolla después de su oxidación a un ion metálico; el procedimiento se lleva a cabo muy fácilmente en contacto con el ambiente húmedo de la herida a la que se aplica. La plata está disponible en el mercado en forma de sales, metal coloidal (esto es, asociado con pequeñas proteínas que mejoran su estabilidad), o finalmente, en forma de metal micronizado. Este último es a menudo preferido porque no mancha la piel o la ropa, especialmente después de la exposición a la luz solar, no tiñe la herida cuando está presente el exudado, y es más fácil de manejar en las etapas de preparación de algunas formas farmacéuticas deseadas (tales como los aerosoles). La plata actúa como un antibacteriano, independientemente de su forma inicial.

50 La combinación de HA y colágeno para crear dispositivos tridimensionales que promueven la curación de heridas y la reepitelización es conocida en el estado de la técnica; por ejemplo, se conocen dispositivos que contienen colágeno unido a derivados de HA modificados químicamente (US6737072, US5939323).

Estas son generalmente preparaciones en las que el HA, presente en cantidades muy grandes, se une a la matriz de colágeno mediante una reacción de reticulación química, para unir las moléculas de HA a las fibras de colágeno, creando en la práctica una nueva entidad química.

5 Por lo tanto, la reticulación aumenta la compacidad y la resistencia del dispositivo. La reticulación se realiza con el uso de productos químicos particulares conocidos como agentes de reticulación, que permiten la formación de "cadenas" entre los polímeros seleccionados, uniéndolos con enlaces covalentes. El rasgo característico de los agentes de reticulación es que poseen grupos funcionales altamente reactivos, capaces de unirse específicamente a otros grupos presentes en el esqueleto de proteínas, péptidos y polímeros en general. Los agentes de reticulación más comúnmente usados son los derivados de carbodiimida, divinil sulfona y BDDE (1,4-butanodiol diglicidil éter) 10 que, debido a su reactividad, son algo tóxicos (por ejemplo, divinil sulfona: <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9925422>; BDDE: <https://www.spectrumchemical.com/MSDS/TCI-B0964.pdf>). Dado que participan activamente en el procedimiento químico de formación de cadenas entre polímeros, y pueden permanecer como espaciadores (como en el caso del BDDE, por ejemplo) en la nueva entidad química formada, las preparaciones finales pueden retener residuos de las sustancias químicas usadas en la reacción de 15 reticulación química, que por lo tanto interfiere con el delicado procedimiento de curación de heridas. Los residuos de agentes de reticulación también se pueden liberar durante la etapa de degradación enzimática que el dispositivo experimenta fisiológicamente después de la aplicación. La reticulación también se puede efectuar con sustancias fotoreactivas que se polimerizan cuando se unen a las moléculas de partida y se irradian con luz UV, creando una red. La persistencia de los productos de reacción en el producto final se debe evaluar en todos estos casos en vista de sus niveles de toxicidad. En el caso de los agentes de reticulación, por ejemplo, los residuos posiblemente liberados son aun altamente reactivos y pueden interferir con el delicado equilibrio que subyace en la curación de la herida a la que se aplicó el dispositivo. Cuando se usan estas sustancias, es una práctica habitual que el producto final se someta a numerosas etapas de lavado, lo que por un lado promueve la seguridad del producto, pero por otro lado complica el procedimiento de fabricación, lo que lo hace menos eficiente y más costoso.

25 Se han producido un número de dispositivos médicos en los últimos años para satisfacer la creciente necesidad de una curación de heridas y reparación de tejidos más segura y rápida.

Entre ellos, el desarrollo de almohadillas a base de colágeno sin duda ha jugado un papel clave para garantizar los mejores materiales para los andamios de regeneración tisular, matrices más porosas para la migración celular y una mejor tolerancia a las alergias para el tejido huésped. En general, dichos dispositivos consisten en andamios tridimensionales diseñados para imitar la capacidad de la matriz extracelular para guiar y encapsular las células migratorias. 30

La matriz extracelular proporciona un tipo de soporte estructural para todos los tejidos conjuntivos animales, que llenan los espacios celulares intersticiales con geles altamente hidratados de polisacáridos y proteínas fibrosas.

Esta estructura fundamental permite que el tejido conectivo contrarreste eficazmente la hinchazón o la compresión debido a la tensión ambiental y/o las variaciones de temperatura. 35

Si la matriz extracelular se ve alterada por quemaduras, llagas u osteoartritis degenerativa crónica, la aplicación de un apósito a base de colágeno a las áreas epidérmicas dañadas o al tejido conjuntivo ayuda a restaurar las condiciones originales nativas.

Al mismo tiempo, reduce la inflamación y proporciona una barrera eficaz contra la infección.

40 En principio, las preparaciones de colágeno deben cumplir una serie de condiciones. El colágeno protésico debe ser absorbido por el tejido cicatrizado de la herida y, posiblemente, degradado por el sistema enzimático del huésped.

Ventajas adicionales de las preparaciones a base de colágeno son su capacidad para absorber cualquier líquido drenado, humedecer el tejido y mejorar la producción de colágeno recién sintetizado por los fibroblastos del huésped.

45 Todavía existe la necesidad de identificar composiciones farmacéuticas alternativas para el tratamiento de lesiones cutáneas con características superiores a las conocidas actualmente, en términos de seguridad (ausencia de posibles residuos tóxicos), eficacia (mejor cicatrización de heridas) y, por último, conveniencia industrial.

La presente invención resuelve el problema existente en el estado de la técnica con las preparaciones que se describen a continuación, obtenidas mediante un procedimiento que es fácil de realizar y no usa ninguna sustancia 50 que promueva la estabilidad de la combinación de HA-colágeno.

Descripción de la figura

La figura muestra el crecimiento de los fibroblastos en las almohadillas de colágeno y de hialuronato sodio en comparación con las almohadillas que contienen solo colágeno. El crecimiento de fibroblastos es indicativo del procedimiento de reepitelización hacia el cual está evolucionando la herida.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas según las reivindicaciones que comprenden colágeno y ácido hialurónico en forma de sal de sodio, que opcionalmente contiene plata.

5 Tales composiciones están en forma de almohadilla. La almohadilla tiene una estructura porosa que se puede cortar y moldear para adaptarla al lecho de la herida, y se prepara sin el uso de agentes de reticulación químicos, como se describe a continuación.

El colágeno usado es de tipo I, de origen equino. Su estructura de triple hélice es análoga a la del colágeno tisular, lo que lo hace particularmente apropiado para los usos según la presente invención.

10 En composiciones en hidrogel y en forma de pulverización seca (no reivindicada), el colágeno se puede usar en forma de un polvo micronizado; en composiciones en forma de almohadilla, se puede usar en forma de un gel al 1% p/p en un portador acuoso que contiene un ácido orgánico, preferiblemente ácido acético, como se obtiene por el procedimiento de extracción del tendón de caballo y posterior purificación.

La composición farmacéutica también contiene ácido hialurónico en forma de sal de sodio en una concentración que varía entre 0.1 y 4% p/p, preferiblemente entre 2 y 3% p/p, e incluso más preferiblemente 2.5% p/p.

15 El ácido hialurónico usado en la presente invención puede derivar de cualquier fuente; por ejemplo, se puede obtener por extracción de panales (EP 138572 B1), por fermentación (de *Streptococcus equi* o *zooepidemicus*), o por biosíntesis (de *Bacillus*, WO2012032154, WO201232153).

El ácido hialurónico tiene un peso molecular medio (MW) que varía entre 400 y  $3 \times 10^6$  Da, en particular entre  $1 \times 10^5$  Da y  $1 \times 10^6$  Da.

20 El ácido hialurónico usado en la presente invención tiene un MW medio que varía entre 130 y 500 kDa, más preferiblemente entre 160 y 230 kDa; este último intervalo MW se abreviará a "MW medio 200 kDa".

Las referencias al peso molecular según la presente invención se refieren al peso molecular promedio en peso, calculado por el método de "viscosidad intrínseca" (Terbojevich et al., Carbohydr Res, 1986, 363-377).

25 De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, las composiciones también pueden incluir plata con el fin de obtener un efecto antibacteriano y antimicrobiano.

La plata puede estar presente en cantidades que varía entre 0.001 y 5% p/p, preferiblemente entre 1 y 2%.

30 La plata puede estar en forma de una sal, preferiblemente citrato de plata, en forma metálica coloidal o en forma de metal micronizado; la sal o la forma metálica coloidal de plata se usa preferiblemente, porque son solubles en agua. Al preparar la pulverización en seco, también se puede usar plata metalizada micronizada, que se formula fácil y generalmente no crea problemas de obstrucción de las boquillas dispensadoras.

En composiciones en forma de hidrogel (no reivindicado), el portador usado es agua.

La composición en forma de hidrogel también puede incluir excipientes tales como agentes reológicos con acción gelificante, agentes humectantes, conservantes, antioxidantes, agentes quelantes, reguladores de pH, etc.

35 La composición en forma de pulverización seca (no reivindicada) también contiene un propelente apropiado (tal como n-butano o isobutano) además de los excipientes conocidos para los expertos en el arte.

Un objeto adicional de la presente invención es un procedimiento para la preparación de dichas composiciones farmacéuticas en forma de almohadilla.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

40 a) homogeneización de colágeno de origen equino en un gel al 1% p/p a  $\text{pH} \approx 3.5$ , en presencia de un ácido orgánico, preferiblemente ácido acético,

b) preparación de una solución acuosa de hialuronato de sodio, a una concentración que varía desde 0.1 y 4% p/p, y ventajosamente entre 2 y 3% p/p,

c) adición de la solución acuosa de hialuronato de sodio al colágeno de origen equino en forma de gel homogeneizado,

45 d) mantener la mezcla resultante bajo agitación suave hasta que se obtenga una mezcla homogénea sin la ayuda de agentes de reticulación,

- e) opcionalmente preparación de una solución acuosa de plata metálica coloidal o una sal de plata, preferiblemente a una concentración que varía entre 0.001 y 5% p/p, más preferiblemente entre 1 y 2% p/p,
- f) adición de la posible solución acuosa de plata metálica coloidal o una sal de plata a la mezcla previamente obtenida,
- 5 g) mantener bajo agitación suave durante 15-60 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 30 minutos, hasta obtener un gel,
- h) mantener el gel en ausencia de agitación durante 5-20 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 10 minutos, para permitir que se asienten las inclusiones,
- 10 i) liofilización del gel para obtener una almohadilla liofilizada con eliminación de residuos de ácidos orgánicos variando la temperatura, preferiblemente desde -25 °C a 25 °C y gradualmente a 60 °C; la almohadilla obtenida de este modo contiene colágeno en una cantidad no inferior al 90% p/p;
- j) corte de la almohadilla liofilizada en almohadillas del tamaño deseado.

La almohadilla obtenida por el procedimiento según la invención se puede insertar en el embalaje primario y, posteriormente, en el embalaje secundario. Finalmente, el producto envasado puede ser esterilizado.

- 15 La formación de la almohadilla claramente no requiere ningún agente químico porque la combinación de colágeno-hialuronato de sodio se obtiene de una manera innovadora, aprovechando las características fisicoquímicas de los dos polímeros.

El colágeno se solubiliza en un ambiente ácido, preferiblemente en presencia de ácido acético; en este caso específico, el gel de colágeno de partida tiene un pH  $\approx$  3.5.

- 20 El hialuronato de sodio se solubiliza en agua purificada, que tiene un pH 5.5, más alto que el del pKa (constante de disociación) del ácido hialurónico ( $\approx$  3); esto significa que en solución, los carboxilos de HA estarán en la forma COO<sup>-</sup>, en la práctica convirtiendo el hialuronato en una base de Lewis. Cuando la solución de hialuronato de sodio se mezcla con gel de colágeno, estos carboxilos interactúan con los grupos amino del colágeno protonado en un ambiente marcadamente ácido, dando lugar a interacciones electrostáticas tales como puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals; el resultado es la formación de una red entre las diversas moléculas, promovida aún más por la complejidad estructural tanto del colágeno como del hialuronato. Por lo tanto, es una interacción fisicoquímica que no requiere ayudas químicas.
- 25

En la presente invención, por lo tanto el hialuronato de sodio se mezcla físicamente con colágeno. Como no se usan agentes reticulantes de ningún tipo, las etapas de lavado y secado posterior no son necesarias para eliminar el exceso de agentes reticulantes y, como se indicó anteriormente, los productos finales son más seguros, ya que están totalmente libres de todo tipo de contaminantes. Por lo tanto, el procedimiento de fabricación es particularmente seguro, simple, económico e industrialmente conveniente.

30

- 35 Además, durante la etapa final de liofilización, las condiciones operativas preferidas son tales que el tamaño de poro de la almohadilla se puede ajustar. Este es un parámetro crucial, ya que la almohadilla debe poder albergar a los fibroblastos presentes en el lecho de la lesión, promoviendo de este modo su viabilidad y desarrollo: si los poros son demasiado pequeños, las células no podrán pasar a través de ellas, sino excesivamente las almohadillas grandes evitarán que la almohadilla se adhiera a las fibras y, en consecuencia, evitarán la proliferación posterior.

- 40 Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden usar para tratar lesiones de la piel y el envejecimiento de la piel causado, por ejemplo, por la edad, la exposición excesiva a la luz solar o dismetabolismos que afectan adversamente el trofismo de la dermis.

Según un aspecto preferido de la invención, las lesiones cutáneas pueden ser úlceras por presión, úlceras arteriales vasculares, úlceras venosas vasculares, úlceras vasculíticas vasculares, úlceras del pie diabético, heridas quirúrgicas y traumáticas y quemaduras de primer y segundo grado.

- 45 Dichas lesiones se pueden presentar como agudas o crónicas, de moderadamente a altamente exudantes, en la etapa de granulación o epitelización.

La combinación de colágeno con hialuronato de sodio hace que la almohadilla sea fuerte pero flexible, mejora la adhesión celular y la posterior proliferación de fibroblastos, y mejora la remodelación de la herida con colágeno recién formado.

- 50 Además de las ventajas descritas para la almohadilla, el hidrogel tiene la ventaja adicional de ser apropiado para la aplicación a heridas de cavidad; los hidrogeles basados en colágeno y hialuronato de sodio también se caracterizan por una excelente capacidad de propagación y son inodoros. Por último, el spray seco es ideal para la aplicación en heridas con bordes particularmente irregulares, ya que llega a cada punto de la lesión.

Los ejemplos dados a continuación ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 (Referencia)

Preparación de 100 g de hidrogel a base de colágeno (3% p/p) y sal de sodio de ácido hialurónico (2.5% p/p)

- 5 - Hialuronato de sodio, MW medio 200 kDa 2,5 g
- Colágeno (tipo I de origen equino): 3 g
- Hidroxietilcelulosa: 0.8 g
- Propilenglicol: 5 g
- MP-Diol glicol: 2,5 g
- 10 - Syndiol 68: 0.5 g
- Agua purificada: c.s. para 100 g

El colágeno y el hialuronato de sodio se solubilizan en agua, bajo agitación a 40 °C, propilenglicol, MP-Diol glicol y Syndiol se añaden en secuencia a la mezcla. La mezcla se enfría luego a temperatura ambiente y se añade hidroxipropilcelulosa con agitación, hasta que se dispersa completamente. La mezcla se mantiene a temperatura ambiente, mezclando ocasionalmente hasta que tenga lugar la gelificación. Los tubos se llenan con el gel de este modo obtenido, y el producto envasado se esteriliza con rayos  $\gamma$ .

Ejemplo 2

(Referencia)

Preparación de 100 g de hidrogel a base de colágeno (3% p/p) y sal de sodio de ácido hialurónico (2.5% p/p)

- 20 - Hialuronato de sodio, MW medio 200 KDa: 2,5 g
- Colágeno (tipo I de origen equino): 3 g
- Goma xantana: 0.8 g.
- Propilenglicol: 10 g
- Polihexanida (PHMB): 0.2 g
- 25 - Agua purificada: c.s. para 100 g

El colágeno y el hialuronato de sodio se solubilizan en agua, bajo agitación a 40 °C. Se añade PHMB a la mezcla hasta que se solubiliza. La goma de xantano se dispersa en la mezcla bajo agitación vigorosa y se enfría a temperatura ambiente, mezclando ocasionalmente hasta que se forma un gel. En este punto, el propilenglicol se incorpora bajo agitación, hasta que sea homogéneo. Los tubos se llenan con el gel de este modo obtenido, y el producto envasado se esteriliza con rayos  $\gamma$ .

Ejemplo 3 (Referencia)

Preparación de 100 g de hidrogel a base de colágeno (3% p/p), sal de sodio de ácido hialurónico (2.5% p/p) y citrato de plata (2%).

- Hialuronato de sodio, MW medio 200 KDa: 2,5 g
- 35 - Colágeno (tipo I de origen equino): 3 g
- Citrato de plata: 2 g.
- Goma xantana: 0.8 g.
- Glicerol: 10 g
- Agua purificada: c.s. para 100 g

El colágeno y el hialuronato de sodio se solubilizan en agua, bajo agitación a 40 °C, y luego se añade citrato de plata. La goma de xantano se dispersa en la mezcla bajo agitación vigorosa y se enfría a temperatura ambiente,

mezclando ocasionalmente hasta que se forma un gel. En este punto, el propilenglicol se incorpora bajo agitación, hasta que sea homogéneo. Los tubos se llenan con el gel de este modo obtenido, y el producto envasado se esteriliza con rayos  $\gamma$ .

Ejemplo 4 (Referencia)

5 Preparación de 100 g de hidrogel a base de colágeno (3% p/p), sal de sodio de ácido hialurónico (2.5% p/p) y plata metálica coloidal (2%).

- Hialuronato de sodio, MW medio 200 kDa: 2,5 g

- Colágeno (tipo I de origen equino): 3 g

- Plata coloidal metálica 2 g.

10 - Carbómero: 1 g

- Hidróxido de sodio: c.s. para pH 6

- Propilenglicol: 10 g

- Polihexanida (PHMB): 0.1 g

- Edetato de sodio: 0.1 g.

15 - Agua purificada: c.s. para 100 g

El carbómero se dispersa en agua con agitación a 45 °C, y el colágeno y el hialuronato de sodio se solubilizan. La plata luego se solubiliza, seguido de PHMB y edetato de sodio. Luego se añade hidróxido de sodio con agitación a pH 6 hasta que se obtiene el gel, y luego se enfría a temperatura ambiente. Finalmente, el propilenglicol se incorpora bajo agitación hasta que sea homogéneo. Los tubos se llenan con el gel de este modo obtenido, y el producto envasado se esteriliza con rayos  $\gamma$ .

20

Ejemplo 5 (Referencia)

Preparación de 100 g de hidrogel a base de colágeno (3% p/p), sal de sodio de ácido hialurónico (2.5% p/p) y plata metálica micronizada (1%).

- Hialuronato de sodio, MW medio 200 KDa: 2,5 g

25 - Colágeno (tipo I de origen equino): 3 g

- Plata metálica micronizada: 1 g.

- Carbómero: 1 g

- Hidróxido de sodio: c.s. para pH 6

- Propilenglicol: 10 g

30 - Polihexanida (PHMB): 0.1 g

- Edetato de sodio: 0.1 g.

- Agua purificada: c.s. para 100 g

El carbómero se dispersa en agua con agitación a 45 °C, y el colágeno y hialuronato de sodio luego se solubilizan. Luego el PHMB y el edetato de sodio se solubilizan. Luego se añade hidróxido de sodio con agitación a pH 6 hasta que se obtiene el gel, y luego se enfría a temperatura ambiente. Finalmente, el propilenglicol y la plata se incorporan bajo agitación hasta que sean homogéneos. Los tubos se llenan con el gel de este modo obtenido, y el producto envasado se esteriliza con rayos  $\gamma$ .

35

Ejemplo 6

40 Preparación de una almohadilla liofilizada de 5x5 cm basada en colágeno de origen equino y hialuronato de sodio al 2.5% p/p

1. Composición:

- colágeno de origen equino en 1% p/p de gel 1000 g (igual a 10 g de colágeno)

- hialuronato de sodio, MW medio 200 kDa 0.25 g.

2. Preparación de producto a granel.

5 En una sala limpia ISO 7, un recipiente limpio hecho de acero inoxidable AISI 316 se llena con la cantidad calculada de colágeno de origen equino en gel al 1%, y la homogeneización se inicia usando un sistema de agitación. La cantidad requerida de hialuronato de sodio en polvo se disuelve en agua purificada en un recipiente separado. Cuando se ha formado la solución de hialuronato de sodio, se introduce en el contenedor que contiene el colágeno de origen equino en forma de gel. Luego la solución se agita suavemente durante 30 minutos. Después de otros 10 minutos sin agitar, se asentarán las inclusiones.

Después de esta etapa, el producto a granel se analiza según las especificaciones de análisis.

10 3. Bandejas de distribución.

En una sala limpia ISO 7, el gel obtenido se distribuye por una bomba peristáltica en la placa situada en un sistema de pesaje calibrado.

4. Procedimiento de liofilización.

15 En una sala limpia de ISO 7, el producto a granel distribuido en las bandejas se congela a -35 °C, durante aproximadamente 4 horas, y luego se coloca a alto vacío durante aproximadamente 17 horas. Durante ese período, el secado comienza cuando la temperatura alcanza aproximadamente los 25 °C; después de aproximadamente 16 horas, las bandejas se calientan a 60 °C, y esa temperatura se mantiene durante aproximadamente 2 horas para eliminar todo rastro de ácido acético contenido en el colágeno de origen equino. Todo el ciclo de liofilización dura aproximadamente 22 horas.

20 El producto acabado contiene 97.5% de colágeno equino y 2.5% de hialuronato de sodio en peso.

5. Producción de una almohadilla de 5x5 cm y embalaje primario.

25 La almohadilla liofilizada obtenida en la bandeja se corta luego en almohadillas que miden 5 x 5 cm con una máquina apropiada; luego, una máquina específica lo inserta en el empaque primario, un blíster formado por una capa de PET o PVC en un lado y una lámina de aluminio barnizada en el otro. Se realiza una inspección visual (100%) del blíster.

6. Embalaje secundario

El embalaje secundario consiste en cajas de cartón.

7. Esterilización

30 Después del embalaje, el producto final no estéril en su configuración final se esteriliza mediante un procedimiento de esterilización por rayos gamma.

Ejemplo 7

Preparación de una almohadilla liofilizada de 5x5 cm basada en colágeno de origen equino, hialuronato de sodio al 2.5% p/p, y plata metálica coloidal 2% p/p

1. Composición:

35 - colágeno de origen equino en 1% p/p de gel 1000 g (igual a 10 g de colágeno)

- hialuronato de sodio, MW medio 200 kDa 0.25 g

- plata metálica coloidal 0.2 g.

2. Preparación de producto a granel.

40 En una sala limpia ISO 7, un recipiente limpio hecho de acero inoxidable AISI 316 se llena con la cantidad calculada de colágeno de origen equino en gel al 1%, y la homogeneización se inicia usando un sistema de agitación. La cantidad requerida de hialuronato de sodio en polvo se disuelve en agua purificada en un recipiente separado. Cuando se ha formado la solución de hialuronato de sodio, se introduce en el contenedor que contiene el colágeno de origen equino en forma de gel. La solución se agita suavemente durante 30 minutos. La plata metálica coloidal se solubiliza en agua, la solución resultante se añade a la mezcla de colágeno de origen equino y hialuronato de sodio, y la mezcla resultante se agita suavemente durante 30 minutos. Después de otros 10 minutos sin agitar, se asentarán las inclusiones.

45



Las etapas descritas en los puntos 3, 4, 5, 6 y 7 del ejemplo 6 se realizan luego para obtener el producto acabado, que contiene 95.5% de colágeno equino, 2.5% de hialuronato de sodio y 2% de plata en peso.

#### Ejemplo 8

5 Preparación de una almohadilla liofilizada de 5x5 cm basada en colágeno de origen equino, hialuronato de sodio al 2.5% p/p, y citrato de plata al 1% p/p de citrato.

##### 1. Composición:

- colágeno de origen equino en 1% p/p de gel 1000 g (igual a 10 g de colágeno)

- hialuronato de sodio, MW medio 200 kDa 0.25 g

- citrato de plata 0.1 g

10 2. Preparación de producto a granel.

15 En una sala limpia ISO 7, un recipiente limpio hecho de acero inoxidable AISI 316 se llena con la cantidad calculada de colágeno de origen equino en gel al 1%, y la homogeneización se inicia usando un sistema de agitación. La cantidad requerida de hialuronato de sodio en polvo se disuelve en agua purificada en un recipiente separado. Cuando se ha formado la solución de hialuronato de sodio, se introduce en el contenedor que contiene el colágeno de origen equino en forma de gel. La solución se agita suavemente durante 30 minutos. El citrato de plata se solubiliza en agua, la solución resultante se añade a la mezcla de colágeno de origen equino y hialuronato de sodio, y la mezcla se agita suavemente durante 30 minutos. Después de otros 10 minutos sin agitar, se asentarán las inclusiones.

20 Las etapas descritas en los puntos 3, 4, 5, 6 y 7 del ejemplo 6 se realizan luego para obtener el producto acabado, que contiene 96.5% de colágeno equino, 2.5% de hialuronato de sodio y 1% de plata en peso.

#### Ejemplo 9

Los dos materiales que se van a examinar, el primero que contiene colágeno y hialuronato de sodio y el segundo que solo contiene colágeno, se preparan mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 6.

25 Los materiales se cortan en trozos de 1x1 cm bajo una campana estéril, se colocan en un Multipocillo-24 y se empapan con medio de cultivo durante 24 horas antes de la siembra. Este procedimiento es necesario para garantizar que la adherencia celular y el crecimiento se evalúen de manera uniforme en cada muestra.

Se siembran 100,000 fibroblastos (3T3), suspendidos en su medio de cultivo, en ambos materiales.

30 La proliferación celular se evalúa 1, 3 y 5 días después de la siembra, con el ensayo MTT. En resumen, dicho ensayo mide cuantitativamente la presencia de actividad de succinato deshidrogenasa en células cultivadas; dicha actividad, que solo está presente en las mitocondrias de las células viables, se usa normalmente como un marcador para controlar la actividad metabólica, la viabilidad y, en consecuencia, el crecimiento de células cultivadas. El ensayo se basa en la conversión del colorante azolio MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolio) de amarillo a azul por succinato deshidrogenasa. La cantidad de colorante azul (formazán) determinada espectrofotométricamente es proporcional a la presencia de succinato deshidrogenasa en el cultivo celular y, en consecuencia, proporcional al número de células viables.

35 Las células se incuban con 0.5 mg/ml de solución de MTT durante 3 horas. Al final de la incubación, el colorante se extrae de la célula con una solución de extracción (isopropanol al 90%, DMSO al 10%) y se lee a la longitud de onda de 540/660 nm.

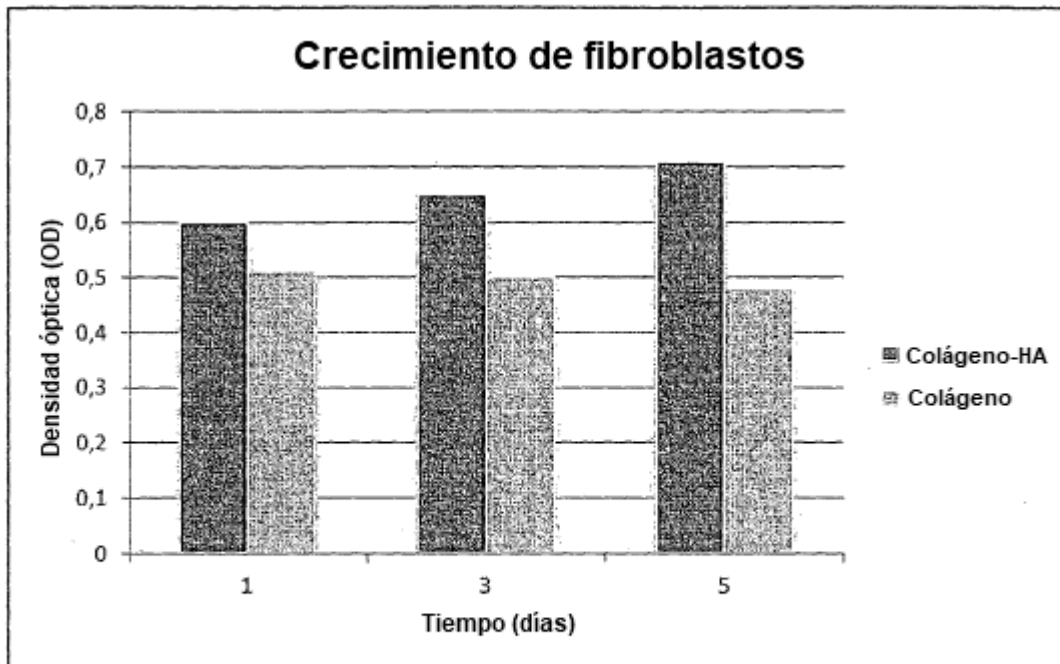
Los resultados se muestran en la figura.

40 Es evidente que la presencia de ácido hialurónico en forma de sal de sodio conduce no solo a una mejor adherencia de las células sembradas al material (véanse los datos del día 1), sino que también aumenta el crecimiento de fibroblastos en comparación con el soporte de colágeno. En este último caso, los valores de densidad óptica permanecen sustancialmente estables, lo que demuestra que los fibroblastos están vivos pero no proliferan.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composiciones farmacéuticas en forma de una almohadilla que comprenden colágeno de tipo I de origen equino y ácido hialurónico en forma de sal de sodio, en la que el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio que varía desde 130 a 500 kDa y una concentración que varía desde 0.1 y 4% p/p, y el colágeno está presente en cantidades no inferiores al 90% p/p, siendo dichas composiciones obtenidas por un procedimiento que comprende:
- a) homogeneización de colágeno de origen equino en un gel al 1% p/p a pH  $\approx$  3.5 en presencia de un ácido orgánico,
- b) preparación de una solución acuosa de ácido hialurónico en forma de sal de sodio con un peso molecular medio que varía desde 130 y 500 kDa a una concentración que varía entre 0.1 y 4% p/p,
- 10 c) adición de la solución acuosa de hialuronato de sodio al colágeno de origen equino en forma de gel homogeneizado,
- d) mantener bajo agitación suave hasta que se obtenga una mezcla homogénea sin la ayuda de agentes de reticulación,
- e) opcionalmente preparación de una solución acuosa de plata metálica coloidal o una sal de plata,
- 15 f) adición de la posible solución acuosa de plata metálica coloidal o una sal de plata a la mezcla previamente obtenida,
- g) mantener la mezcla resultante bajo agitación suave durante 15-60 minutos hasta obtener un gel,
- h) mantener el gel en ausencia de agitación durante 5-20 minutos para permitir que se asienten las inclusiones,
- 20 i) liofilización del gel para obtener una almohadilla liofilizada con eliminación de residuos de ácido orgánico al variar la temperatura, que contiene colágeno en la cantidad no inferior al 90% p/p;
- j) corte de la almohadilla liofilizada en almohadillas del tamaño deseado.
2. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 1, en las que la almohadilla está libre de agentes de reticulación.
- 25 3. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 1, en las que el ácido hialurónico tiene un peso molecular que varía desde 160 a 230 kDa con un MW medio de 200 kDa.
4. Composiciones farmacéuticas según las reivindicaciones 1-3, en las que el hialuronato de sodio tiene una concentración que varía desde 2 a 3% p/p.
5. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 4, en las que el hialuronato de sodio tiene una concentración de 2.5% p/p.
- 30 6. Composiciones farmacéuticas según las reivindicaciones 1-5, que comprenden además plata en una cantidad que varía desde 0.001 a 5% p/p.
7. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 6, en las que la plata está presente en una cantidad que varía desde 1 a 2% p/p.
- 35 8. Composiciones farmacéuticas según las reivindicaciones 1-7 para uso en el tratamiento de lesiones cutáneas, en las que las lesiones cutáneas se seleccionan del grupo que consiste en úlceras por presión, úlceras arteriales vasculares, úlceras venosas vasculares, úlceras vasculíticas vasculares, úlceras del pie diabético, heridas quirúrgicas y traumáticas, quemaduras de primer y segundo grado.
- 40 9. Procedimiento para la preparación de composiciones farmacéuticas en forma de almohadilla que comprenden colágeno de tipo I de origen equino en cantidades no inferiores al 90% p/p y ácido hialurónico en forma de sal de sodio, en el que el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio que varía desde 130 a 500 kDa y una concentración que varía desde 0.1 a 4% p/p, que comprende las siguientes etapas:
- a) homogeneización de colágeno de origen equino en un gel al 1% p/p a pH  $\approx$  3.5 en presencia de un ácido orgánico,
- b) preparación de una solución acuosa de hialuronato de sodio a una concentración que varía entre 0.1 y 4% p/p,
- 45 c) adición de la solución acuosa de hialuronato de sodio al colágeno de origen equino en forma de gel homogeneizado,

- d) mantener bajo agitación suave hasta que se obtenga una mezcla homogénea sin la ayuda de agentes de reticulación,
- e) opcionalmente preparación de una solución acuosa de plata metálica coloidal o una sal de plata,
- 5 f) adición de la posible solución acuosa de plata metálica coloidal o una sal de plata a la mezcla previamente obtenida,
- g) mantener la mezcla resultante con agitación suave durante 15-60 minutos, hasta obtener un gel,
- h) mantener el gel en ausencia de agitación durante 5-20 minutos para permitir que se asienten las inclusiones,
- i) liofilización del gel para obtener una almohadilla liofilizada con eliminación de residuos de ácidos orgánicos variando la temperatura, que contiene colágeno en una cantidad no inferior al 90% p/p;
- 10 j) corte de la almohadilla liofilizada en almohadillas del tamaño deseado.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el ácido orgánico en la etapa a) es ácido acético.
11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que en la etapa b) la solución acuosa de hialuronato de sodio se prepara a una concentración ventajosamente entre 2 y 3% p/p.
- 15 12. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que en la etapa e) la solución acuosa de plata metálica coloidal o una sal de plata se prepara a una concentración que varía entre 0.001 y 5% p/p, preferiblemente entre 1 y 2% p/p.
13. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que en la etapa g) la mezcla resultante se mantiene bajo agitación suave durante aproximadamente 30 minutos.
14. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que en la etapa h) el gel se mantiene en ausencia de agitación durante aproximadamente 10 minutos.
- 20 15. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que en la etapa j) la temperatura varía desde -25 °C a 25 °C y gradualmente a 60 °C.



Figura