

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 057**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)
C08H 1/00 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)
C08L 89/00 (2006.01)
A61K 8/65 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2012 PCT/US2012/053853**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13036568**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2012 E 12772834 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2753647**

54 Título: **Composiciones de carga dérmica a base de ácido hialurónico/colágeno y métodos para preparar las mismas**

30 Prioridad:

06.09.2011 US 201161531533 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.01.2019

73 Titular/es:

ALLERGAN, INC. (100.0%)
2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92612, US

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 697 057 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 de carga dérmica a base de ácido hialurónico/colágeno y métodos para preparar las mismas

5 **Solicitud relacionada**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE. UU. con n.º 61/531.533, presentada el 6 de septiembre de 2011.

10 **Antecedentes**

La presente descripción se refiere, en general, a composiciones de carga dérmica y, más concretamente, se refiere a composiciones de carga dérmica inyectable que incluyen ácido hialurónico y colágeno reticulados. El ácido hialurónico y el colágeno son componentes estructurales clave de los tejidos humanos. Estos biopolímeros se han usado ampliamente para construir materiales y estructuras base de ingeniería de tejidos para el cultivo celular y la medicina regenerativa.

El envejecimiento de la piel es un fenómeno progresivo, tiene lugar a lo largo del tiempo y puede verse afectado por factores de estilo de vida, tales como el consumo de alcohol, el tabaco y la exposición al sol. El envejecimiento de la piel facial se puede caracterizar por atrofia, flacidez y engrosamiento. La atrofia se corresponde con una reducción masiva del espesor del tejido cutáneo. La flacidez de los tejidos subcutáneos conduce a un exceso de piel y a ptosis y conduce a la aparición de mejillas y párpados caídos. El engrosamiento se refiere a un aumento en el peso en exceso por hinchamiento de la parte baja de la cara y el cuello. Estos cambios están típicamente asociados a sequedad, pérdida de elasticidad y textura rugosa.

El hialuronano, también conocido como ácido hialurónico (HA) es un glicosaminoglicano no sulfatado que se distribuye ampliamente por todo el cuerpo humano en los tejidos conjuntivo, epitelial y neuronal. El hialuronano es abundante en las diferentes capas de la piel, donde tiene múltiples funciones tales como, por ejemplo, para garantizar una buena hidratación, para ayudar en la organización de la matriz extracelular, para actuar como material de carga; y para participar en mecanismos de reparación de tejidos. Sin embargo, con la edad disminuye la cantidad de hialuronano, colágeno, elastina y otros polímeros de matriz presentes en la piel. *Por ejemplo*, la exposición repetida a la luz ultravioleta, por ejemplo, del sol, provoca que las células dérmicas disminuyan tanto su producción de hialuronano como aumenten la velocidad de su degradación. Esta pérdida de hialuronano da como resultado diversas afecciones cutáneas tales como, por ejemplo, imperfecciones, defectos, enfermedades y/o trastornos, y similares. Por ejemplo, existe una fuerte correlación entre el contenido de agua en la piel y niveles de hialuronano en el tejido dérmico. A medida que la piel envejece, se reduce la cantidad y la calidad de hialuronano en la piel. Estos cambios llevan a la deshidratación y la formación de arrugas en la piel.

Las cargas dérmicas son útiles en el tratamiento de una afección del tejido blando y en otras terapias de la piel porque las cargas pueden reemplazar los polímeros de matriz endógena, o potenciar/facilitar la función de los polímeros de matriz existentes, con el fin de tratar estas afecciones cutáneas. En el pasado, tales composiciones han sido usadas en aplicaciones cosméticas para rellenar arrugas, líneas, pliegues, cicatrices, y para mejorar el tejido dérmico, tal como, *por ejemplo*, para rellenar labios delgados, o resaltar ojos hundidos o mejillas poco profundas. Los productos de carga dérmica anteriores eran preparados generalmente a partir de colágenos. Un polímero de matriz común usado en las composiciones de carga dérmica modernas es hialuronano. Debido a que el hialuronano es natural para el cuerpo humano, generalmente se tolera adecuadamente y es un tratamiento de bastante bajo riesgo para una amplia variedad de afecciones cutáneas.

Originalmente, las composiciones que comprenden hialuronano se prepararon a partir de polímeros naturales, que existen en un estado no reticulado. Aunque presenta una biocompatibilidad y afinidad excelentes para las moléculas de agua, el hialuronano natural presenta propiedades biomecánicas deficientes como carga dérmica. Un motivo principal es que debido a que este polímero está no reticulado, es altamente soluble y, como tal, se elimina rápidamente cuando se administra en una región de la piel. Esta eliminación *in vivo* se consigue principalmente mediante una rápida degradación de los polímeros, principalmente degradación enzimática a través de hialuronidasa y degradación química a través de radicales libres. Por lo tanto, aunque sigue en uso comercial, las composiciones que comprenden polímeros de hialuronano no reticulados tienden a degradarse en el plazo de pocos días después de la administración y así a requerir una reinyección bastante frecuente para mantener su efecto de mejora de la piel.

Para minimizar el efecto de estas rutas de degradación *in vivo*, los polímeros de matriz se reticulan entre sí para formar un hidrogel estabilizado. Debido a que los hidrogeles que comprenden polímeros de matriz reticulados son una sustancia más sólida, las cargas dérmicas que comprenden tales hidrogeles permanecen en su lugar en el sitio de implante durante más tiempo. Además, estos hidrogeles son más adecuados como carga dérmica porque la naturaleza más sólida de los mismos mejora las propiedades mecánicas de la carga, permitiendo que la carga levante y rellene mejor una región de la piel. Los polímeros de hialuronano están de forma típica reticulados con un agente de reticulación para formar enlaces covalentes entre polímeros de hialuronano. Tales polímeros reticulados forman una red de hidrogel menos soluble en agua que es más resistente a la degradación, y por lo tanto requiere una reinyección menos frecuente que las composiciones de hialuronano no reticulado. Por ejemplo, el documento

US 2005/186673 A1 se refiere a una matriz macromolecular reticulada que comprende ácido hialurónico y colágeno de tipo I, en donde el ácido hialurónico se reticula con el colágeno mediante 1-etil-(3,3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y métodos para preparar dicha matriz macromolecular reticulada.

- 5 La presente invención proporciona un nuevo método para producir una matriz macromolecular reticulada como composiciones de carga dérmica inyectables para mejorar el aspecto de la piel.

Resumen

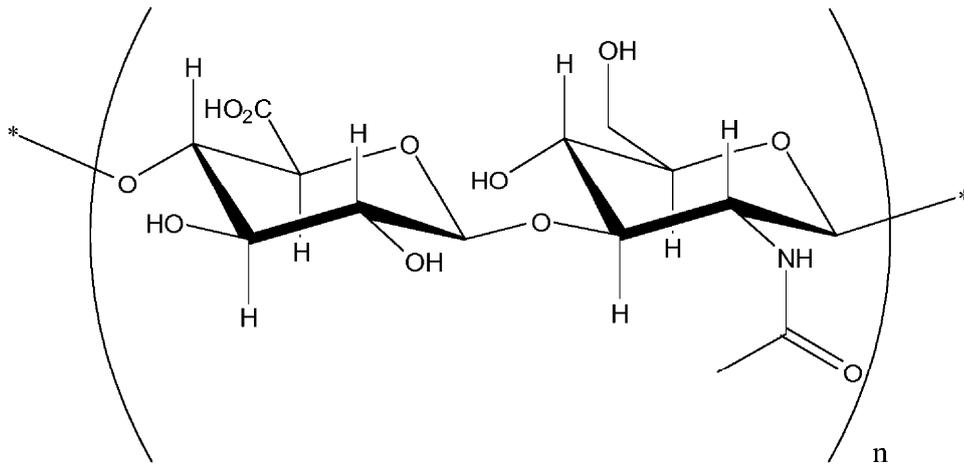
- 10 En consecuencia, se proporciona un método para producir una matriz macromolecular reticulada como nueva composición de carga dérmica, en donde el método comprende (i) disolver ácido hialurónico y un colágeno en una solución acuosa para formar una solución de reacción previa acuosa, en donde la solución de reacción previa acuosa comprende además una sal o tiene un pH inferior a 4; (ii) modificar la solución de reacción previa acuosa para formar una mezcla de reacción de reticulación que comprende el ácido hialurónico, el colágeno, una carbodiimida soluble en agua, N-hidroxisuccinimida o N-hidroxisulfosuccinimida y, cuando está presente, la sal; y (iii) permitir que la mezcla de reacción de reticulación reaccione para reticular el ácido hialurónico con el colágeno y forme una matriz macromolecular reticulada, en donde la mezcla de reacción de reticulación tiene un pH más alto que la solución de reacción previa acuosa. Algunas realizaciones incluyen composiciones de hidrogel homogéneas preparadas a partir de ácido hialurónico y colágeno. Según la invención, el ácido hialurónico y el colágeno se reticulan en condiciones en las que ambos componentes son inicialmente solubles en solución acuosa.

Breve descripción de los dibujos

- 25 La figura 1A es una representación de un barrido de frecuencia para el gel del ejemplo 3.
- La figura 1B es una representación un barrido de deformación para el gel del ejemplo 3.
- La figura 2 es un perfil de extrusión para el gel del ejemplo 3.
- 30 La figura 3 representa imágenes de microscopio electrónico de barrido (imágenes de SEM) del gel del ejemplo 4 mostradas a 50X (A), 1.000 x (B) y 40.000 x (C).

Descripción detallada

- 35 Los hidrogeles de ácido hialurónico reticulado, colágeno y colágeno reticulado, tales como los usados en cargas dérmicas, no promueven activamente la infiltración celular y penetración tisular. De manera similar, el colágeno simplemente mezclado en hidrogeles de ácido hialurónico no promueve la integración tisular o la generación de tejido *de novo*. Sin embargo, algunas composiciones descritas en el presente documento promueven la migración celular en los hidrogeles y la formación de tejido dentro de los geles cuando se implantan *in vivo*.
- 40 Se pueden sintetizar hidrogeles de ácido hialurónico-colágeno mediante el acoplamiento de un ácido hialurónico con un colágeno mediante el uso de un agente de acoplamiento, tal como una carbodiimida. En estos hidrogeles, el ácido hialurónico puede servir como un componente de unión de agua biocompatible, proporcionando degradación volumétrica e isovolumétrica. De forma adicional, el colágeno puede transmitir adhesión celular y dominios de señalización para promover la unión celular, migración celular, y otras funciones celulares tales como deposición de matriz extracelular. Los biopolímeros forman hidrogeles homogéneos con propiedades adaptables, hinchamiento y propiedades mecánicas. Las composiciones se pueden preparar para ser inyectables para la implantación mínimamente invasiva a través de una jeringa y aguja.
- 45
- 50 El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano no sulfatado que mejora la retención de agua y resiste estreses hidrostáticos. Es no inmunogénico y se puede modificar químicamente de numerosos modos. El ácido hialurónico puede ser aniónico a intervalos de pH alrededor o por encima del pKa de sus grupos de ácido carboxílico.



HA=Ácido hialurónico

5 El colágeno es una proteína que forma fibrillas y láminas que portan cargas de tensión. El colágeno tiene, además, sitios de unión a integrina específicos para la adhesión celular y se sabe que promueve la adhesión, migración y proliferación celulares. El colágeno estar cargado positivamente debido a su alto contenido de residuos de aminoácido básicos tales como arginina, lisina e hidroxilisina.

10 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 o bien ácido hialurónico o bien colágeno y, por lo tanto, puede precipitar en solución acuosa cuando las dos macromoléculas están juntas en una mezcla. Además, los colágenos son, frecuentemente, solubles solamente a pH bajo y pueden precipitar en solución cuando se llevan a un pH susceptible al acoplamiento de carbodiimida.

15 En determinadas condiciones, un ácido hialurónico y un colágeno pueden combinarse en un líquido acuoso en el que ambos componentes son solubles. Un ácido hialurónico y un colágeno pueden entonces reticularse mientras ambos se disuelven 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 sal se pueden ajustar para ayudar a prevenir la formación de complejo poliónico entre ácido hialurónico aniónico y colágeno catiónico. También pueden ayudar a prevenir la formación de la microfibrillas de colágeno, lo que da como resultado la precipitación en solución y puede evitar la reticulación.

20 La invención se refiere a un método para reticular ácido hialurónico y colágeno. Este método comprende generalmente una etapa de disolución que da como resultado una solución de reacción previa acuosa. En una etapa de disolución, el ácido hialurónico y el colágeno se disuelven en una solución acuosa que tiene un pH bajo, es decir, inferior a 4, y/o una sal para formar una solución de reacción previa acuosa.

25 Un método de reticulación de ácido hialurónico - colágeno comprende además una etapa de activación. En una etapa de activación, se modifica una solución de reacción previa acuosa al menos añadiendo un agente de acoplamiento soluble en agua y/o aumentando el pH de la solución. Si es necesario, una sal también pueden añadirse para mantener el ácido hialurónico y el colágeno en solución al pH superior. Así, 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 mayor que la solución de reacción previa acuosa de la que se derivó. La mezcla de reacción de reticulación se deja reaccionar para reticular de ese modo el ácido hialurónico y el colágeno.

30 Según la invención, se puede aumentar el pH de la solución de reacción previa acuosa y se puede dejar que se produzca una cantidad sustancial de formación de fibra en la solución antes de añadir el agente de acoplamiento soluble en agua. En algunas realizaciones, el agente de acoplamiento soluble en agua puede añadirse a la solución de reacción previa acuosa antes de que se produzca prácticamente cualquier formación de fibra.

35 Una mezcla de reacción de reticulación puede reaccionar para formar una matriz macromolecular reticulada. Dado que la reacción tiene lugar en una solución acuosa, una matriz macromolecular reticulada se puede dispersar en un líquido acuoso en forma de hidrogel a medida que se forma mediante una reacción de reticulación. Una matriz macromolecular reticulada puede mantenerse en hidrogel debido a que, en muchos casos, puede usarse una matriz macromolecular reticulada en forma de hidrogel.

45

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

5 Después de que se haya tenido lugar la reacción de reticulación, la matriz macromolecular reticulada puede particularse u homogeneizarse a través de una malla. Esto puede ayudar a formar una suspensión acuosa o hidrogel inyectable. Una malla usada para particular una matriz macromolecular reticulada puede tener cualquier tamaño de poro adecuado en función del tamaño de las partículas deseadas. En algunas realizaciones, la malla puede tener un tamaño de poro de aproximadamente 10 micras a aproximadamente 100 micras, de
10 aproximadamente 50 micras a aproximadamente 70 micras, o aproximadamente 60 micras.

Un hidrogel que comprende una matriz molecular reticulada se puede tratar mediante diálisis para su esterilización u otros fines. La diálisis se puede llevar a cabo colocando una membrana semipermeable entre el hidrogel y otro líquido para permitir que el hidrogel y el líquido intercambien moléculas o sales que pueden pasar entre la membrana.

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

20 La diálisis se puede llevar a cabo frente a una solución tamponadora, lo que significa que el líquido en el otro lado de la membrana del hidrogel puede ser una solución tamponadora. En algunas realizaciones, la solución tamponadora puede ser una solución de tampón fosfato estéril que puede comprender tampón fosfato, cloruro de potasio y/o cloruro sódico. Una solución de tampón fosfato estéril puede ser sustancialmente isosmótica con respecto a fluido fisiológico humano. Por lo tanto, cuando se completa la diálisis, el componente líquido de un
25 hidrogel puede ser sustancialmente isosmótico con respecto a fluido fisiológico humano.

En algunas realizaciones de la presente descripción, 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 forma un hidrogel. Un líquido acuoso puede comprender agua con una sal disuelta en él, tal como un tampón fosfato, cloruro de sodio, cloruro de potasio, etc. En algunas realizaciones, un líquido acuoso puede comprender agua, cloruro sódico a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, cloruro potásico a una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 3 mM, y tampón fosfato a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, en donde el pH del líquido es de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.

35 Un hidrogel puede usarse en un producto estético de tejido blando. Un producto estético incluye cualquier producto que mejora cualquier propiedad estética de cualquier parte de un animal o ser humano. 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
40 humano; en 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 de la presente descripción incluyen un método para mejorar una cualidad estética de una característica anatómica de un ser humano. Mejorar una cualidad estética de una característica anatómica de un ser humano incluye mejorar cualquier clase de cualidad estética incluyendo el aspecto, sensación táctil, etc., y mejorar cualquier característica anatómica, incluyendo aquellas de la cara, extremidades, senos, glúteos, etc. Un método de este tipo puede comprender: inyectar o implantar un dispositivo estético en un tejido del ser humano para mejorar así la cualidad estética de la característica anatómica; en donde el dispositivo estético comprende una composición de matriz macromolecular reticulada descrita en el presente documento. En algunas
50 realizaciones, la matriz macromolecular reticulada usada en el producto puede estar en forma de hidrogel.

En algunas realizaciones de la presente descripción, 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, de aproximadamente 500 Pa a aproximadamente 5000 Pa, de aproximadamente 850 Pa, aproximadamente 852 Pa, aproximadamente 560 Pa, aproximadamente 556 Pa, aproximadamente 1000 Pa, o cualquier valor en un intervalo limitado por, o entre, cualquiera de estos valores.

En algunas realizaciones de la presente descripción, 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 de la presente descripción, un hidrogel de un complejo macromolecular reticulado puede tener una fuerza de extrusión promedio de aproximadamente 10 N a aproximadamente 50 N, de aproximadamente 20 N a 30 N o aproximadamente 25 N, cuando el hidrogel se fuerza a través de una jeringa de 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 de aproximadamente 4 mm a aproximadamente 10 mm.

5 Una matriz macromolecular reticulada puede tener propiedades de hinchamiento adaptables basándose en las condiciones de reacción y dilución de hidrogel. En algunas realizaciones, una matriz macromolecular reticulada puede tener una relación de hinchamiento de aproximadamente 20 a aproximadamente 200. Una relación de hinchamiento es la relación del peso de la matriz macromolecular reticulada después de la síntesis con respecto al peso de la matriz macromolecular reticulada sin nada de agua. La matriz macromolecular reticulada puede tener un poder de hinchamiento de aproximadamente 1 a aproximadamente 7. El poder de hinchamiento es la relación del peso de la matriz macromolecular reticulada cuando está saturada con agua con respecto al peso de la matriz macromolecular reticulada después de la síntesis.

15 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 200.000 daltons a aproximadamente 10.000.000 daltons, de aproximadamente 500.000 daltons a aproximadamente 10.000.000 daltons, de aproximadamente 1.000.000 daltons a aproximadamente 5.000.000 daltons, o de aproximadamente 1.000.000 daltons a aproximadamente 3.000.000 daltons. 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. Así, los intervalos mencionados anteriormente también pueden aplicarse al peso molecular de un componente de ácido hialurónico, por ejemplo, de aproximadamente 200.000 daltons a aproximadamente 10.000.000 daltons, de aproximadamente 500.000 daltons a aproximadamente 10.000.000 daltons, de aproximadamente 1.000.000 daltons a aproximadamente 5.000.000 daltons, o de aproximadamente 1.000.000 daltons a aproximadamente 3.000.000 daltons. El término "peso molecular" se aplica en esta situación a una parte de la matriz aunque el componente de ácido hialurónico puede no ser realmente una molécula separada debido a la reticulación. En algunas realizaciones, un ácido hialurónico de mayor peso molecular puede dar como resultado una matriz molecular reticulada que puede tener un módulo volumétrico mayor y/o menor hinchamiento.

30 La concentración de ácido hialurónico en una solución de reacción previa o una mezcla de reacción de reticulación puede variar. En algunas realizaciones, el ácido hialurónico está presente en 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 6 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml, o aproximadamente 24 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de ácido hialurónico superior puede llevar a una mayor rigidez y/o más hinchamiento en la matriz macromolecular reticulada.

35 Cualquier tipo de colágeno puede usarse en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. En algunas realizaciones pueden usarse colágeno de tipo I, colágeno de tipo III, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo VI, o una combinación de los mismos. Un colágeno puede derivarse de cultivo celular, tejido animal, o medios recombinantes, y puede derivarse de fuentes humana, porcina o bovina. Algunas realizaciones comprenden colágeno derivado de cultivo de fibroblastos humanos. Algunas realizaciones comprenden colágeno que se ha desnaturalizado dando gelatina.

40 La concentración de colágeno en una solución de reacción previa o una mezcla de reacción de reticulación puede variar. En algunas realizaciones, el colágeno puede estar presente en 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.

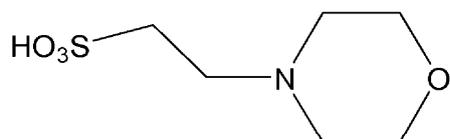
50 En algunas realizaciones, la relación en peso de ácido hialurónico con respecto a colágeno en una solución de reacción previa o solución de reacción previa acuosa o una mezcla de reacción de reticulación (por ejemplo [peso de ácido hialurónico]/[peso de colágeno]) puede ser de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 2, o 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. Así, la matriz macromolecular reticulada resultante puede tener una relación en peso de componente de ácido hialurónico con 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 7, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2, aproximadamente 1 o aproximadamente 2. Una relación en peso más alta de ácido hialurónico con respecto a colágeno puede dar como resultado una matriz macromolecular reticulada con mayor hinchamiento, menor rigidez y/o menor adhesión celular.

60 Al aumentar la cantidad tanto de ácido hialurónico como de colágeno puede dar como resultado una matriz macromolecular reticulada con mayor rigidez.

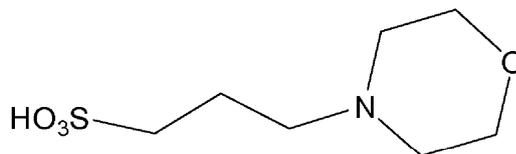
65 Una sal puede ayudar a seleccionar las cargas negativas de ácido hialurónico a partir de las cargas positivas de colágeno, y puede así impedir la precipitación de un complejo iónico poliónico en disolución. Sin embargo, concentraciones altas de sal pueden reducir la solubilidad de algunos componentes en disolución. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la concentración de sal de una solución de reacción previa acuosa o una mezcla de reacción de reticulación puede ser lo

suficientemente alta para seleccionar las cargas de modo que el complejo iónico poliónico no se forma, pero también es lo suficientemente baja para que los componentes de la mezcla permanezcan en disolución. Por ejemplo, la concentración total de sal de algunas soluciones de reacción previa acuosas o mezclas de reacción de reticulación puede ser de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM, o aproximadamente 150 mM. En algunas realizaciones, una concentración de sal más alta puede aumentar la eficacia de una reacción de reticulación, lo que puede dar como resultado un menor hinchamiento y/o mayor rigidez.

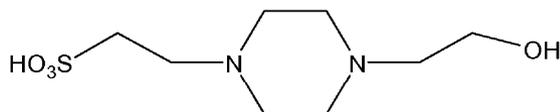
Algunas sales en una solución de reacción previa acuosa o una mezcla de reacción de reticulación pueden ser tampones no coordinantes. Puede usarse cualquier tampón no coordinante que pueda tamponar la mezcla y no forme complejos de coordinación con agentes de acoplamiento o átomos de metal. Ejemplos de tampones no coordinantes adecuados pueden incluir, aunque no de forma limitativa, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)etanosulfónico (HEPES), ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]propanosulfónico (HEPPS), ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (CHES), ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico (CAPS), etc.



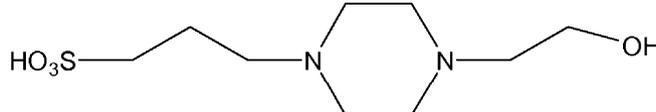
MES



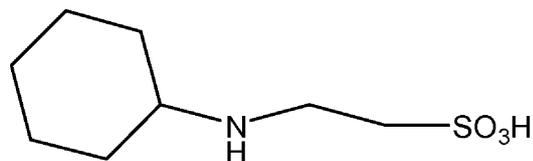
MOPS



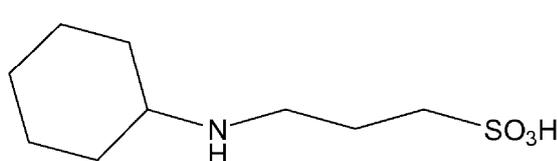
HEPES



HEPPS



CHES



CAPS

La concentración de un tampón no coordinante puede variar. Por ejemplo, algunas soluciones de reacción previa acuosas 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 de reacción previa acuosas o mezclas de reacción de reticulación comprenden MES en 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.

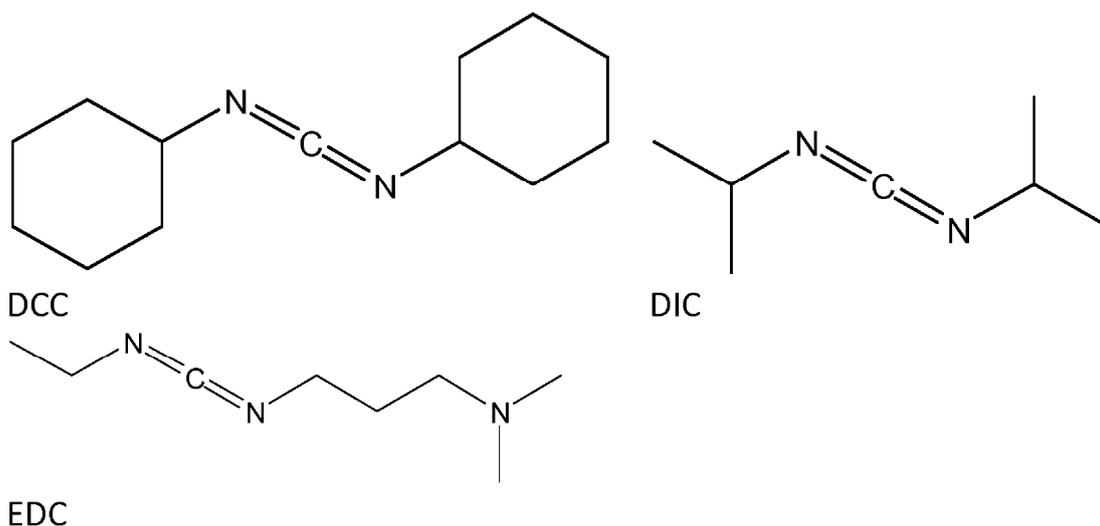
Las sales no tamponadoras también se pueden incluir en una solución de reacción previa acuosa o una mezcla de reacción de reticulación como alternativa o adicionalmente a las sales tamponadoras. Algunos ejemplos pueden incluir sales inorgánicas tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de litio, bromuro de potasio, bromuro de sodio, bromuro de litio y similares. La concentración de una sal no tamponadora puede variar. Por ejemplo, algunas mezclas pueden tener una concentración de sal no tamponadora 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 % p/v, aproximadamente 0,9 % p/v, aproximadamente 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.

Según la invención, el pH de una solución de reacción previa acuosa es inferior al pH de una mezcla de reacción de reticulación. Si el contenido de sal de la solución de reacción previa acuosa es bajo, el pH puede ser inferior para mejorar la solubilidad del ácido hialurónico y el colágeno. Si el contenido de sal es mayor, el pH puede ser mayor en la solución de reacción previa acuosa. En algunas realizaciones, el pH de la mezcla de reacción previa acuosa 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 concentraciones bajas de sal, el pH puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3. En algunas realizaciones, un pH de aproximadamente 5,4 puede dar como resultado una matriz macromolecular reticulada con mayor rigidez y/o menor hinchamiento.

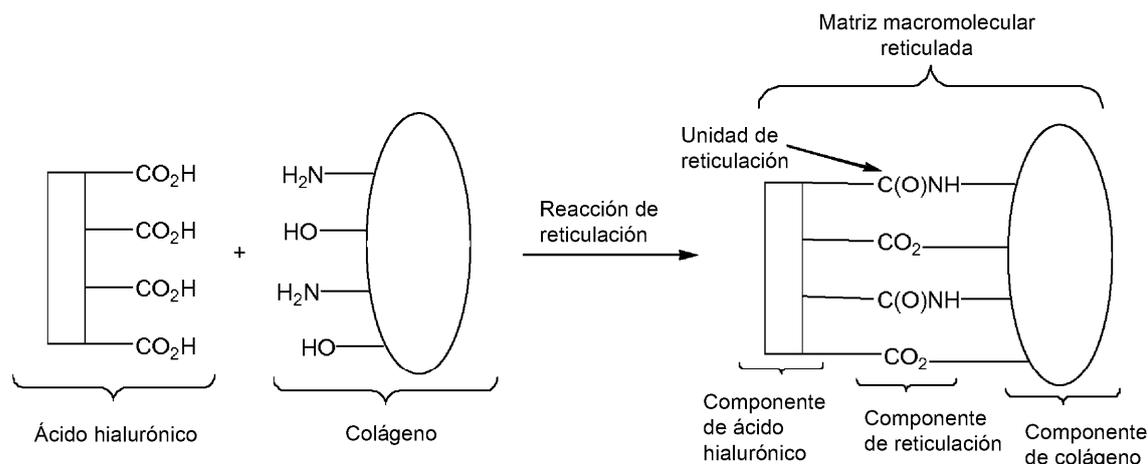
En algunas realizaciones, el pH se puede ajustar a neutro para permitir la gelificación del colágeno o la formación de fibra antes de añadir un agente de acoplamiento.

- 5 En algunas realizaciones, el pH se puede ajustar a neutro inmediatamente antes de, aproximadamente en el momento, o después de añadir un agente de acoplamiento, de modo que se reduce la gelificación de colágeno o sustancialmente no tiene lugar.

10 Puede usarse cualquier agente de acoplamiento soluble en agua que pueda reticular ácido hialurónico dando colágeno. Algunos ejemplos no limitativos 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), etc. Los agentes de acoplamiento de carbodiimida pueden facilitar la formación de enlaces éster o amida sin llegar a formar parte del enlace. En otras palabras, un enlace éster o un enlace amida pueden comprender átomos de un grupo carboxilato de uno de ácido hialurónico o colágeno, y un grupo hidroxilo o un grupo amina del otro. Sin embargo, pueden usarse otros agentes de acoplamiento que llegan a formar parte del grupo de reticulación. La concentración de un agente de acoplamiento puede variar. En algunas realizaciones, un agente de acoplamiento puede estar presente en 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 en una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 50 mM. Aumentar la concentración de carbodiimida hasta aproximadamente 50 mM puede dar como resultado una matriz macromolecular reticulada con mayor rigidez de hidrogel y/o menor hinchamiento.

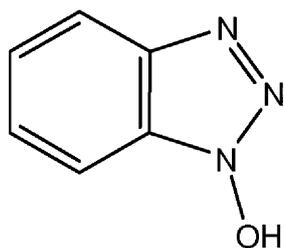


- 25 Una reacción de reticulación incluye cualquier ácido hialurónico de reacción que está unido covalentemente al colágeno en una pluralidad (por ejemplo, más de 1) de posiciones. En algunas realizaciones, una reacción de reticulación puede representarse mediante el esquema 1 a continuación.

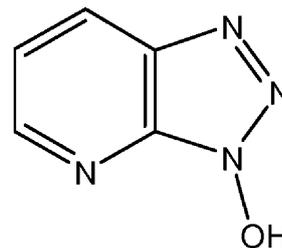


Esquema 1

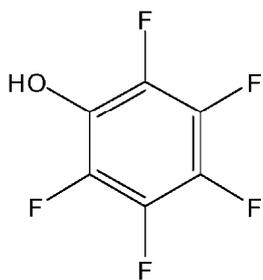
- En el esquema 1 se representan solo algunos de los grupos funcionales de reacción, y no se muestran muchos grupos funcionales que pueden reaccionar en una reacción de reticulación, pero que también pueden permanecer sin reaccionar. Por ejemplo, OH , CO_2H , $-\text{NHCOCH}_3$ y otros grupos en el ácido hialurónico que no se muestran pueden reaccionar, pero también pueden permanecer sin reaccionar. Del mismo modo, el colágeno puede tener grupos adicionales que pueden reaccionar, pero también pueden permanecer sin reaccionar, tales como OH , SH , CO_2H , NH_2 , etc. Adicionalmente, pueden reaccionar menos grupos que los representados.
- En el esquema 1, grupos funcionales tales como CO_2H en el ácido hialurónico pueden reaccionar con grupos funcionales en el colágeno tales como NH_2 y OH para formar varias unidades de reticulación. Las unidades de reticulación constituyen conjuntamente el componente de reticulación. En el esquema 1, un componente de acoplamiento no llega a formar parte de una unidad de reticulación. Sin embargo, para algunos agentes de acoplamiento, al menos parte de un agente de acoplamiento puede incorporarse en una unidad de reticulación. El componente de ácido hialurónico incluye ácido hialurónico que ha reaccionado para llegar a formar parte de una matriz macromolecular reticulada. El componente de colágeno incluye colágeno que ha reaccionado para llegar a formar parte de una matriz macromolecular reticulada. Además de la reticulación entre ácido hialurónico y colágeno, el ácido hialurónico o el colágeno pueden estar parcialmente autorreticulados. Por lo tanto, el esquema 1 se presenta por comodidad para comprender la reacción de reticulación, pero no refleja necesariamente una estructura química real. Por ejemplo, una matriz molecular reticulada puede ser una red de macromoléculas de ácido hialurónico y macromoléculas de colágeno, con muchas macromoléculas reticuladas con más de una macromolécula.
- 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 con el componente de colágeno. Como se ha explicado anteriormente, un componente de reticulación comprende una pluralidad de unidades de reticulación, o uniones de unión covalente individuales, entre el componente de ácido hialurónico y el componente de colágeno. Una unidad de reticulación puede ser simplemente una unión directa entre un componente de ácido hialurónico y componentes de colágeno, de manera que el agente de acoplamiento puede no incorporarse en la matriz macromolecular reticulada. Como alternativa, una unidad de reticulación puede contener átomos o grupos adicionales del agente de acoplamiento, de manera que al menos una parte del agente de acoplamiento puede llegar a formar parte de la matriz macromolecular reticulada. Al menos una parte de las unidades de reticulación puede comprender un enlace éster o un enlace amida. En algunas realizaciones, al menos una parte de las unidades de reticulación puede ser $-\text{CON}-$ o $-\text{CO}_2-$, donde N es un nitrógeno de un residuo de aminoácido.
- Puede usarse un agente de activación para aumentar la velocidad de la reacción de reticulación y el número de unidades de reticulación en el producto final. En algunas realizaciones, un agente de activación puede ser un triazol, tal como hidroxibenzotriazol (HOBT) o 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAT); un fenol fluorado tal como pentafluorofenol; una succinimida, tal como N-hidroxisuccinimida (NHS) o N-hidroxisulfosuccinimida (sulfoNHS), y similares.



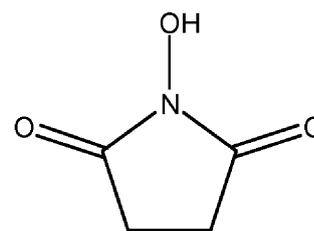
HOBT



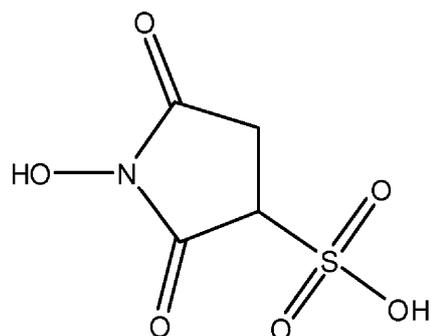
HOAT



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, aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, el agente de activación puede ser NHS o sulfoNHS está a una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, el agente de activación puede ser sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida, 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 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 3 mg/ml, colágeno humano de tipo III a una concentración de aproximadamente 3 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 100 mM, cloruro sódico a una concentración de aproximadamente 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 humano de tipo III a una concentración de aproximadamente 6 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 180 mM, cloruro sódico a una concentración de aproximadamente 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.

concentración de aproximadamente 1 mg/ml aproximadamente a 15 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 200 mM, cloruro sódico a una concentración de aproximadamente 0,5 % en peso a aproximadamente 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.

Ejemplo 1

Se creó una solución de ácido hialurónico y colágeno disolviendo 30 mg de una sal sódica de ácido hialurónico de 2 MDa (córnea) en 10 ml de solución de colágeno de tipo III 3 mg/ml en HCl 10 mM (FibroGen). Se añadió sal tamponadora de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (195,2 mg) a la solución junto con 90 mg de NaCl para formar una solución de reacción previa a un pH de 2,5. A continuación, se ajustó el pH a 5,4 mediante la adición de 200 µl de NaOH 1 N. A continuación, se añadieron 95,9 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCl y 108,6 mg de sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida a la solución de ácido hialurónico/colágeno (III) y se mezcló completamente. La reacción de reticulación continuó durante 18 horas antes de que el gel se particulara a través de una malla de tamaño de poro de 60 micras. A continuación de la calibración, el gel se esterilizó mediante diálisis a través de una membrana de éster de celulosa de límite de corte de peso molecular de 20 kDa frente al 70 % de isopropanol / 30 % de agua durante 3 h a 4 °C. La diálisis se continuó a continuación frente a tampón fosfato estéril durante 72 horas a 4 °C, con cuatro cambios de tampón. El gel se dispensó a continuación en jeringas en condiciones asépticas.

Ejemplo 2

Se creó una solución de ácido hialurónico disolviendo 60 mg de sal sódica de ácido hialurónico de 2 MDa (córnea) en 20 ml de tampón de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico 100 mM con 0,9 % en peso de NaCl a pH 4,7. Después de la hidratación y disolución total del ácido hialurónico, esta solución se mezcló con 20 ml de solución de colágeno (III) humano 3 mg/ml en HCl 10 mM (FibroGen). El pH de la solución resultante de ácido hialurónico/colágeno (III) se ajustó a 5,4 con NaOH 1 N. La solución se liofilizó a continuación para una esponja seca y se reconstituyó en 10 ml de agua destilada para obtener una solución de 6 mg/ml de ácido hialurónico y 6 mg/ml de colágeno (III). A continuación, se añadieron 192 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCl y 217 mg de sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida a la solución de ácido hialurónico/colágeno (III) y se mezclaron completamente. La reacción de reticulación continuó durante 18 horas antes de que el gel se particulara a través de una malla de tamaño de poro de 60 micras. A continuación de la calibración, el gel se esterilizó mediante diálisis a través de una membrana de éster de celulosa de límite de corte de peso molecular de 20 kDa frente al 70 % de isopropanol / 30 % de agua durante 3 h a 4 °C. La diálisis se continuó a continuación frente a tampón fosfato estéril durante 72 horas a 4 °C, con cuatro cambios de tampón. El gel se dispensó a continuación en jeringas en condiciones asépticas.

Ejemplo 3

Colágeno (I) de cola de rata (Roche) se disolvió a 20 mg/ml en ácido clorhídrico 0,01 N. Se disolvió ácido hialurónico, 2 MDa de peso molecular, (córnea) a 40 mg/ml en sal tamponadora de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) 100 mM con 0,9 % en peso de NaCl a pH 4,7. Se preparó tampón MES (500 mM) a pH 6,3 disolviendo 43 mg de NaCl y 95 mg de sal tamponadora de MES en tampón MES 100 mM con 0,9 % en peso de NaCl a pH 4,7. Se creó una solución de reacción previa mezclando 4,2 g de la solución de colágeno (I) de rata, 4,2 g de la solución de ácido hialurónico y 1,05 ml del tampón MES. Se preparó una solución de activación de 114 mg de sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida en 530 µl de tampón MES 100 mM con 0,9 % en peso de NaCl a pH 5,2. Se preparó una solución de acoplamiento de 100,6 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCl en 530 µl de tampón MES 100 mM con 0,9 % en peso de NaCl a pH 5,2. A continuación, la mezcla de reacción se creó añadiendo 500 µl de solución de activación seguido de 500 µl de solución de acoplamiento a 9 g de solución de ácido hialurónico/colágeno. La mezcla de reacción se transfirió a un vial de vidrio y se centrifugó durante 5 min a 4000 rpm para retirar las burbujas de aire. La reacción continuó durante 18 horas a 4 °C. A continuación, el gel se particuló a través de una malla de tamaño de poro de 100 micras. A continuación de la calibración, el gel se esterilizó mediante diálisis a través de una membrana de éster de celulosa de límite de corte de peso molecular de 20 kDa frente al 70 % de isopropanol / 30 % de agua durante 3 h a 4 °C. La diálisis se continuó a continuación frente a tampón fosfato estéril durante 72 horas a 4 °C, con cuatro cambios de tampón. El gel se dispensó a continuación en jeringas en condiciones asépticas.

Ejemplo 4

Colágeno (I) de cola de rata en ácido clorhídrico 0,01 N se concentró de 5 mg/ml a 12 mg/ml usando un dispositivo de filtración centrífuga con un límite de corte de peso molecular de 20 kDa. Ácido hialurónico (120 mg, 2 MDa) se añadió a 10 ml de la solución de colágeno y se dejó hidratar durante 60 minutos. A continuación, la solución se homogeneizó pasando de jeringa a jeringa a través de un conector luer. A continuación, se añadieron 90 mg de NaCl (0,9 % en peso) y 200 mg de sal tamponadora de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (100 mM) a la solución y se mezclaron. A continuación, se añadieron 98 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCl y 111 mg de sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida (50 mM de cada una) a la solución y se mezclaron.

rápidamente. Por último, se añadieron 200 µl de NaOH 1 N a la solución, que se mezcló al pasar 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 retirar las burbujas de aire. La reacción continuó durante 18 horas a 4 °C. A continuación, el gel se particuló a través de una malla de tamaño de poro de 100 micras. A continuación de la calibración, el gel se esterilizó mediante diálisis a través de una membrana de éster de celulosa de límite de corte de peso molecular de 20 kDa frente al 70 % de isopropanol / 30 % de agua durante 3 h a 4 °C. La diálisis se continuó a continuación frente a tampón fosfato estéril durante 72 horas a 4 °C, con cuatro cambios de tampón. El gel se dispensó a continuación en jeringas en condiciones asépticas.

10 Ejemplo 5

Se utilizó una reología de placa paralela oscilatoria para caracterizar las propiedades mecánicas de los geles usando un MCR 301 Anton Paar. Se usó un diámetro de placa de 25 mm a una altura de separación 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 por un barrido de deformación entre 0,1 % y 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 las mediciones de barrido de frecuencia a 5 Hz.

El gel del Ejemplo 1 tenía un módulo de almacenamiento (G') de 505 Pa y un módulo de pérdida (G'') de 70 Pa.

El gel del ejemplo 3 tenía un módulo de almacenamiento (G') de 2.580 Pa y un módulo de pérdida (G'') de 155 Pa.

Los barridos de frecuencia y de deformación para el gel del ejemplo 3 se muestran en la figura 1.

25 Ejemplo 6

Para determinar la fuerza requerida para extrudir los geles, estos se expulsaron de unas 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 el gel del ejemplo 3 se muestra en la figura 2. El gel tenía una fuerza de extrusión promedio de 12,2 N de 4 a 10 mm.

35 Ejemplo 7

Los geles se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se secaron por liofilización. A continuación, la muestra secada se sometió a formación de imágenes usando un microscopio electrónico de barrido (SEM) Hitachi S - 4500. Las imágenes de SEM del gel del ejemplo 4 se muestran en la figura 3 a 50X (A), 1.000X (B) y 40.000X (C). La naturaleza fibrilar del colágeno (I) se conserva parcialmente en el hidrogel.

40 Ejemplo 8

Colágeno (I) de cola de rata en ácido clorhídrico 0,01 N se concentró de 5 mg/ml a 12 mg/ml usando un dispositivo de filtración centrífuga con un límite de corte de peso molecular de 20 kDa. Se añadió sal sódica de ácido hialurónico (120 mg, 2 MDa) a 10 ml de la solución de colágeno y se dejó hidratar durante 60 minutos. A continuación, la solución se homogeneizó pasando de jeringa a jeringa a través de un conector luer, y se añadieron 93 mg de NaCl, 201 mg de sal tamponadora de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico y 200 µl de NaOH 1 N a la solución y se mezclaron. A continuación se añadieron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCl (98 mg) y 111 mg de sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida 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 retirar las burbujas de aire. La reacción continuó durante 16 horas a 4 °C. A continuación, el gel se particuló a través de una malla de tamaño de poro de 60 micras. A continuación de la calibración, el gel se esterilizó mediante diálisis a través de una membrana de éster de celulosa de límite de corte de peso molecular de 20 kDa frente al 70 % de isopropanol / 30 % de agua durante 3 h a 4 °C. La diálisis se continuó a continuación frente a tampón fosfato estéril durante 72 horas a 4 °C, con cuatro cambios de tampón. El gel se dispensó a continuación en jeringas en condiciones asépticas.

60 Ejemplo 9

Se probó la biocompatibilidad de los geles con una inyección de muestra intradérmica de 50 µl en ratas Sprague-Dawley. Los implantes se retiraron a 1 semana y los explantes se analizaron mediante histología con H&E y tinción con CD68 de marcador de macrófago. Tres imágenes 20X de la tinción de CD68 se calificaron de 0 a 4 basándose en el grado de tinción. A continuación, estos valores se promediaron para dar una calificación de muestra. Se analizaron cuatro muestras para cada gel. Los resultados de las pruebas de biocompatibilidad de los ejemplos 3, 4 y 8, junto con varias cargas dérmicas comercialmente disponibles, se presentan en la tabla 1.

	promedio	desvest
Ejemplo 3	2,08	0,74
Ejemplo 4	2,58	0,63
Ejemplo 8	2,67	0,58
Juvederm® Ultra Plus	1,83	0,19
Juvederm® Voluma	1,92	0,42

Tabla 1: Calificaciones de tinción CD68 para los ejemplos 3, 4 y 8, así como cargas dérmicas comerciales.

Ejemplo 10

La citotoxicidad del gel del ejemplo 4 se determinó por NAMSa según el método de recubrimiento con agarosa de la norma ISO 10993-5: Evaluación biológica de dispositivos médicos - Parte 5: Pruebas para la citotoxicidad *in vitro*. Unos pocillos por triplicado se dosificaron con 0,1 ml del gel colocado sobre discos de filtro así como 0,1 ml de solución de NaCl al 0,9 % colocada sobre un disco de filtro y polietileno de alta densidad de 1 cm de longitud como controles negativos y una parte de 1 cm x 1 cm de látex como control positivo. Cada uno se colocó sobre una superficie de agarosa recubriendo directamente una monocapa subconfluente de células de fibroblasto de ratón L929. Después de incubar a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 24 horas, los cultivos se examinaron macroscópicamente y microscópicamente en busca de cualquier lisis celular o morfología celular anómala. Los artículos de prueba se calificaron de 0 a 4 basándose en la zona de lisis celular en proximidad a la muestra.

El gel del ejemplo 4 no mostró evidencia alguna de causar ninguna toxicidad o lisis celular y su citotoxicidad fue calificada con un grado 0.

Ejemplo 11

La reactividad intracutánea de gel en conejos del ejemplo 4 se evaluó por NAMSa según la norma ISO 10993-10L, Evaluación biológica de dispositivos médicos - Parte 10: Pruebas de irritación e hipersensibilidad de tipo retardado. Se preparó un extracto del gel en una solución de NaCl al 0,9 % (relación de gel - solución salina 4:20), y 0,2 ml del extracto se inyectaron por vía intracutánea en cinco sitios separados en el lado derecho del lomo de cada uno de los tres animales. El control de extracto se inyectó de manera similar en el lado izquierdo del lomo de cada animal. Los sitios de inyección se observaron a las 24, 48 y 72 horas después de la inyección en busca de signos de eritema y edema. El eritema y el edema se calificaron, cada uno, en una escala de 0 a 4 en cada sitio para cada punto temporal en cada animal. La calificación media global se determinó dividiendo la suma de las calificaciones entre el número total de calificaciones.

El gel del ejemplo 4 tenía una calificación media global de 0, la misma que la calificación global del grupo control. Esto indicó la ausencia de signos de eritema o edema procedentes del extracto de gel.

Ejemplo 12

Sal sódica de ácido hialurónico, 2 MDa de peso molecular, se disolvió en solución de colágeno (I) humano en ácido clorhídrico 0,01 N (Advanced BioMatrix). Se añadió cloruro de sodio al 0,9 % en peso y se añadió MES a 100 mM a la solución y se mezcló. Se dejó hidratar el ácido hialurónico durante 1 h y la solución se homogeneizó mediante mezclado de jeringa a jeringa. El pH de la solución se ajustó a 5,4 mediante la adición de hidróxido sódico 1 N. Se añadió 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCl (50 mM) y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida (50 mM) a la solución de ácido hialurónico/colágeno y se mezcló 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 retirar las burbujas de aire. El gel resultante se dejó reaccionar durante 16 horas a 4 °C. A continuación, el gel se particuló a través de una malla de tamaño de poro de 100 micras. A continuación de la calibración, el gel se esterilizó mediante diálisis a través de una membrana de éster de celulosa de límite de corte de peso molecular de 20 kDa frente al 70 % de isopropanol / 30 % de agua durante 3 h a 4 °C. La diálisis se continuó a continuación frente a tampón fosfato estéril, pH 7,4, durante 72 horas a 4 °C, con cuatro cambios de tampón. El gel se dispensó a continuación en jeringas en condiciones asépticas.

Este procedimiento se usó para producir hidrogeles con concentraciones variables de ácido hialurónico y colágeno. Cuando sea necesario, colágeno (I) humano en ácido clorhídrico 0,01 N se concentró desde 3 mg/ml hasta la concentración de reacción deseada en dispositivos de filtración centrífugos de límite de corte de peso molecular de 20 kDa. Una muestra de 50 ml de cada gel se sintetizó, se esterilizó mediante exposición a un 70 % de isopropanol, y se purificó mediante diálisis frente a tampón fosfato, pH 7,4. Los geles sintetizados se describen en la Tabla 2 junto con sus propiedades reológicas. Se utilizó una reología de placa paralela oscilatoria para caracterizar las propiedades reológicas de los geles usando un MCR 301 Anton Paar. Un diámetro de placa de 25 mm se utilizó en una altura de separación de 1 mm. El módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') se determinaron a una deformación de 2 % y 5 Hz.

Muestra:	HA	[Col(I)]	G'	G''
ID	(mg/ml)	(mg/ml)	(Pa)	(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

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

Ejemplo 13

5 Con el fin de determinar la concentración de biopolímero en geles, se comparó el peso del gel hidratado con el del gel secado. Se pesó una muestra de 2 ml de gel y se secó por congelación instantánea en nitrógeno líquido seguido de liofilización a - 50 °C y 0,003 kPa (0,02 Torr). También se pesó una solución del tampón apropiado y se secó de la misma manera para expresar el contenido de sal del gel. El contenido total de sólidos del gel se calculó dividiendo el peso seco entre el volumen húmedo, suponiendo 1 g/ml de densidad del gel húmedo, para dar un valor en mg/ml. El contenido de sólidos de sal se restó entonces de este valor para determinar la concentración de biopolímero en el gel.

ID de muestra	[HA] (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

Tabla 3: Concentraciones finales de hidrogeles de ácido hialurónico - colágeno (I) humano

Ejemplo 14

15 Las relaciones de hinchamiento para los geles se determinaron en relación con el contenido inicial de agua y se midieron mediante la monitorización del aumento en la masa de gel después de equilibrar con el tampón 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 vórtex durante 30 segundos. A continuación, 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 cubo oscilante durante 5 minutos. A continuación se decantó el tampón de sobrenadante 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.

ID de muestra	[HA] (mg/ml)	[Col(I)] (mg/ml)	Relación de hinchamiento
A	3	3	1,0
B	12	6	1,7
C	16	8	1,7
D	12	12	1,5
E	24	12	1,7

Tabla 4: Relaciones de hinchamiento de hidrogeles de ácido hialurónico - colágeno (I) humano

Ejemplo 15

30 Se disolvió ácido hialurónico (800 mg, 2 MDa de peso molecular) en 50 ml de una solución de colágeno (I) porcino 8 mg/ml en ácido clorhídrico 0,01 N. Se añadió cloruro de sodio al 0,9 % en peso y se añadió ácido 2-[morfolino] etanosulfónico a 100 mM a la solución y se mezcló. Se dejó hidratar el ácido hialurónico durante 1 h y la solución se homogeneizó mediante mezclado de jeringa a jeringa. El pH de la solución se ajustó a 5,4 mediante la adición de hidróxido sódico 1 N. Se añadió 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCl (50 Mm) y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida (50 mM) a la solución de ácido hialurónico/colágeno y se mezcló 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 retirar las burbujas de aire. El gel resultante se dejó

reaccionar durante 16 horas a 4 °C. A continuación, el gel se particuló a través de una malla de tamaño de poro de 100 micras. A continuación de la calibración, el gel se esterilizó mediante diálisis a través de una membrana de éster de celulosa de límite de corte de peso molecular de 20 kDa frente al 70 % de isopropanol / 30 % de agua durante 3 h a 4 °C. La diálisis se continuó a continuación frente a tampón fosfato estéril, pH 7,4, durante 72 horas a 4 °C, con cuatro cambios de tampón. El gel se dispensó a continuación en jeringas en condiciones asépticas.

Ejemplo 16

Se realizan inyecciones subcutáneas en bolo (1 ml) de los hidrogeles de muestra por medio de cánulas a través de una pequeña incisión en el dorso de ratones atímicos. Las muestras inyectadas consisten en ácido hialurónico reticulado a 16 mg/ml, colágeno (I) humano reticulado a 16 mg/ml, y muestra B, ácido hialurónico - colágeno (I) humano reticulado del ejemplo 12. A las seis semanas, la duración volumétrica de las muestras se determina junto con la evaluación histológica de penetración celular e infiltración tisular. Se ha descubierto que el ácido hialurónico reticulado tiene una duración del 90 % en volumen, el colágeno (I) humano reticulado tiene una duración del 30 % en volumen, y el ácido hialurónico - colágeno (I) humano reticulado tiene una duración del 85 % en volumen. La evaluación histológica indicó que el ácido hialurónico reticulado y el colágeno reticulado tienen poco o ninguna penetración tisular, mientras que las células y la matriz extracelular recientemente depositada se encuentran por toda la muestra de ácido hialurónico - colágeno (I) humano.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una matriz macromolecular reticulada que comprende: disolver ácido hialurónico y un colágeno en una solución acuosa para formar una solución de reacción previa acuosa, en donde la solución de reacción previa acuosa comprende además una sal o tiene un pH inferior a 4; y modificar la solución de reacción previa acuosa para formar una mezcla de reacción de reticulación que comprende:
 5 el ácido hialurónico;
 el colágeno;
 10 una carbodiimida soluble en agua;
 N-hidroxisuccinimida o N-hidroxisulfosuccinimida; y cuando está presente, la sal; y permitir que la mezcla de reacción de reticulación reaccione de modo que reticule el ácido hialurónico con el colágeno y forme una matriz macromolecular reticulada;
 en donde la mezcla de reacción de reticulación tiene un pH mayor que la solución de reacción previa acuosa.
 15
2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de modificar la solución de reacción previa acuosa para formar una mezcla de reacción de reticulación comprende aumentar el pH de la solución de reacción previa acuosa y permitir que se produzca la formación de fibra antes de añadir la carbodiimida soluble en agua.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de modificar la solución de reacción previa acuosa para formar una mezcla de reacción de reticulación comprende añadir la carbodiimida soluble en agua a la solución de reacción previa acuosa antes de que se produzca la formación de fibra.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en donde la sal comprende cloruro de sodio en una concentración de 80 mM a 330 mM en la mezcla de reacción de reticulación.
5. El método de la reivindicación 1, en donde la carbodiimida soluble en agua es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida en una concentración de 20 mM a 100 mM en la mezcla de reacción de reticulación.
 30
6. El método de la reivindicación 1, en donde la mezcla de reacción de reticulación comprende además un tampón no coordinante en una concentración de 10 mM a 1 M.
- 35 7. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de particular la matriz macromolecular reticulada a través de una malla que tiene un tamaño de poro de 10 μm a 100 μm .
8. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de esterilizar la matriz macromolecular reticulada mediante diálisis;
 40 en donde la diálisis se realiza frente a una solución de tampón fosfato estéril que comprende tampón fosfato, cloruro de potasio y cloruro de sodio; siendo la solución de tampón fosfato estéril sustancialmente isosmótica con respecto al fluido fisiológico humano; y en donde la diálisis es a través de una membrana que tiene un límite de corte de peso molecular de 5.000 a 100.000 Daltons.

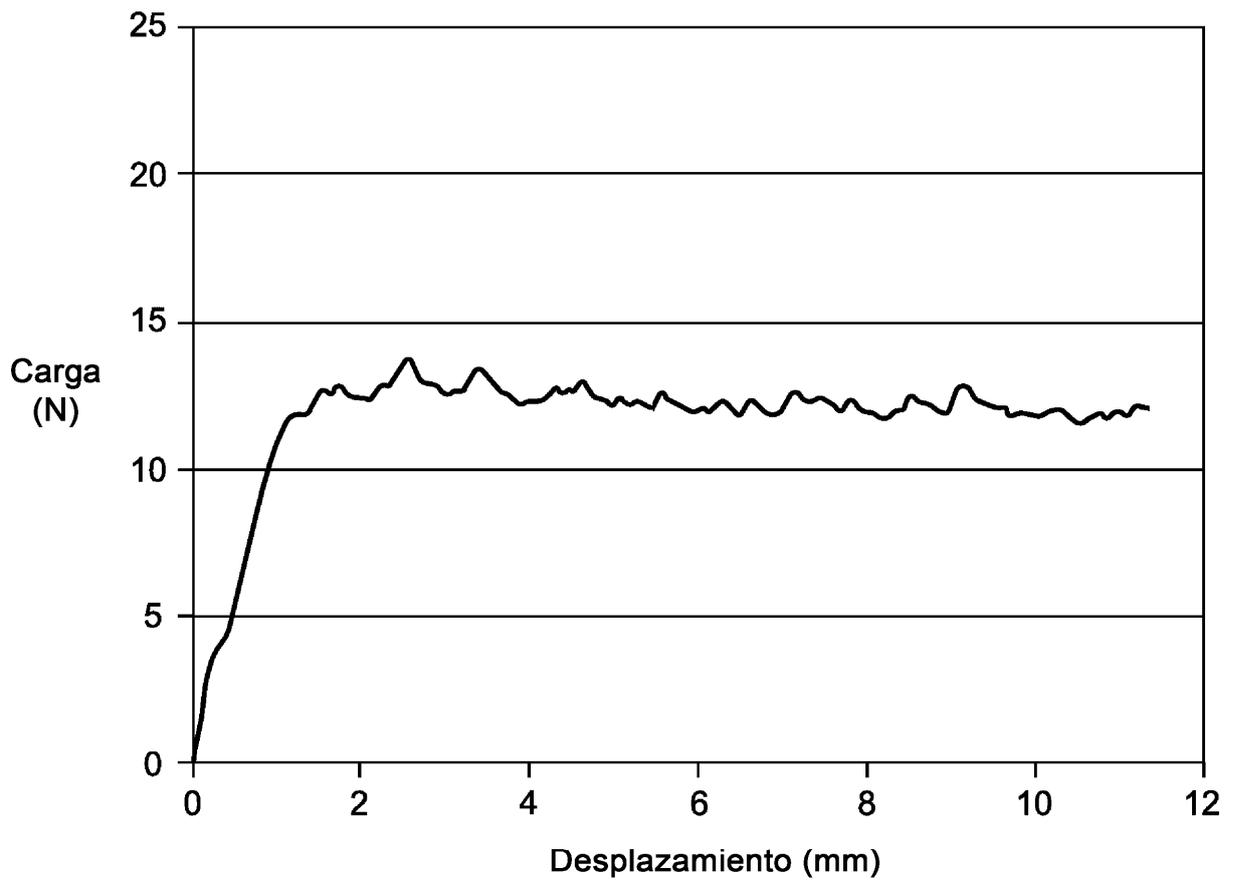


FIG. 2

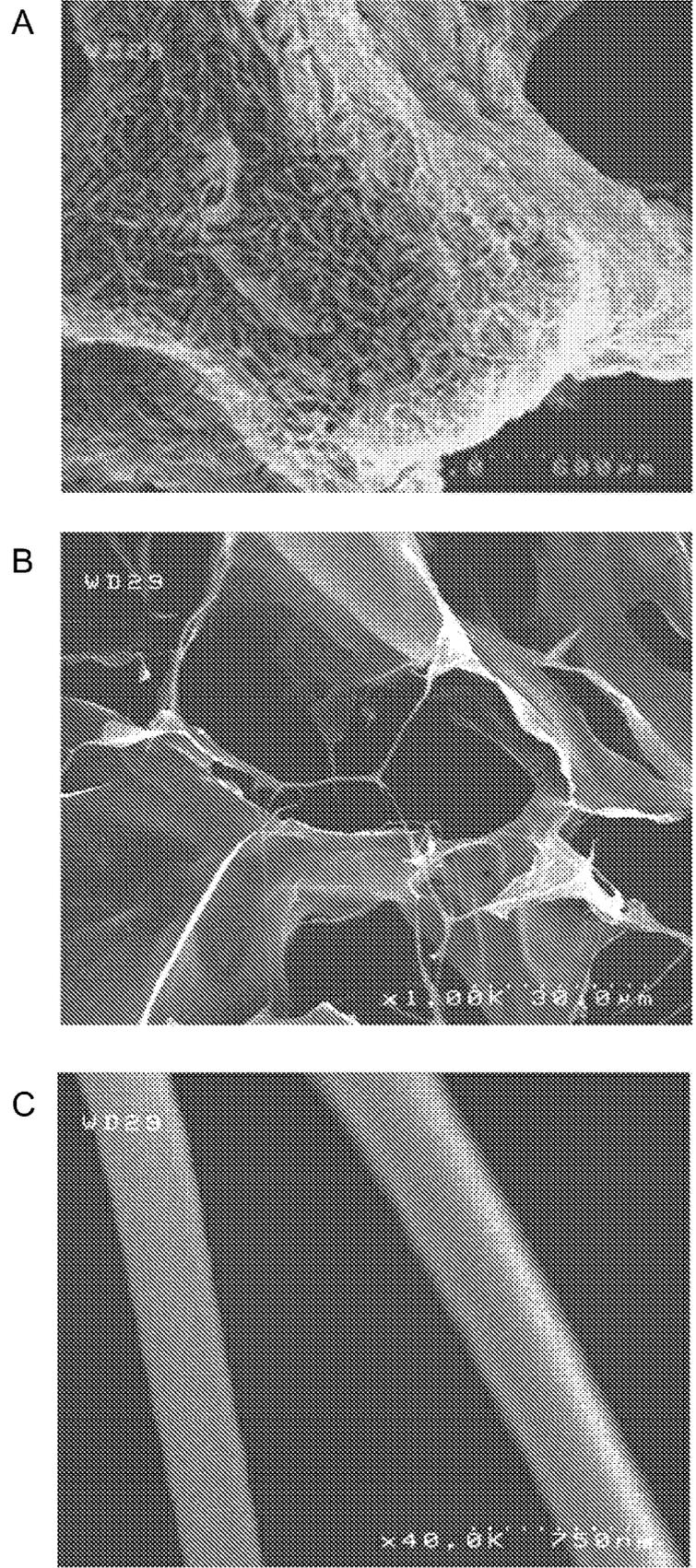


FIG. 3