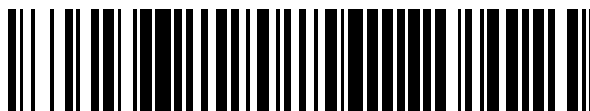


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 207**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/24** (2006.01)  
**A61L 27/20** (2006.01)  
**C08H 1/00** (2006.01)  
**A61K 8/64** (2006.01)  
**A61L 27/22** (2006.01)  
**A61L 27/26** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2011** **PCT/AU2011/001503**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012** **WO12068619**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2011** **E 11842615 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019** **EP 2643029**

54 Título: **Preparación y/o formulación de proteínas reticuladas con polisacáridos**

30 Prioridad:

**23.11.2010 US 344940 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.09.2019**

73 Titular/es:

**ALLERGAN PHARMACEUTICALS  
INTERNATIONAL LIMITED (100.0%)  
Clonshaugh Business & Technology Park  
Dublin 17, D17 E400, IE**

72 Inventor/es:

**SOMMER-KNUDSEN, JENS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 725 207 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

Preparación y/o formulación de proteínas reticuladas con polisacáridos

5 **Campo**

La presente descripción se refiere a y puede aplicarse a la preparación y/o formulación de proteínas reticuladas con polisacáridos.

10 **Antecedentes**

En la actualidad, los implantes inyectables se usan para dar volumen o aumentar los tejidos en aplicaciones médicas que van desde reconstrucción de las cuerdas vocales, pasando por la incontinencia fecal y urinaria, hasta tratamientos estéticos de las arrugas. Los implantes actuales se elaboran a partir de una gama de materiales incluido el ácido hialurónico, proteínas tales como el colágeno, polímeros tales como el ácido poliláctico y biomateriales tales como la hidroxiapatita.

Por ejemplo, el hyaluronic acid (ácido hialurónico - "HA"), denominado a veces hialuronano o hialuronato, es un mucopolisacárido natural que se halla, por ejemplo, en el líquido sinovial, el humor vítreo, las paredes de los vasos sanguíneos y el cordón umbilical, y en otros tejidos conjuntivos. El polisacárido consiste en restos N-acetil-D-glucosamina y ácido D-glucurónico alternantes unidos mediante enlaces  $\beta$ -1-3 glucuronídico y  $\beta$ -1-4 glucosaminídico alternantes. Los productos a base de ácido hialurónico se reticulan utilizando diversos enfoques, incluidas, por ejemplo, sustancias químicas, tales como BDDE y divinilsulfano. El ácido hialurónico que se reticula es después micronizado para permitir su inyección (p. ej., Restylane® y Juvéderm®). Los implantes de ácido hialurónico producen su efecto mediante el aumento de los tejidos y la retención de humedad en el implante y son lentamente resorbidos por el cuerpo.

Otro ejemplo lo constituyen los implantes a base de colágeno que se han basado en colágeno extraído de tejidos de animales o humanos, adicionalmente reticulados (p. ej., glutaraldehído (Zyplast®) o reticulaciones basadas en ribosa (Evolence®)) y a continuación suspendidos en solución salina lista para la implantación. Los implantes de colágeno producen su efecto aumentando el volumen del tejido de modo similar a los productos de ácido hialurónico; sin embargo, también permiten una mayor infiltración celular en el implante y la producción de material de colágeno naciente.

Los enfoques en los que se utilizan polímeros, tales como el ácido poliláctico (p. ej., Sculptra®) y biomateriales, tales como la hidroxiapatita (p. ej., Radiess®) se han basado en la producción de una suspensión de material en forma de partículas en un gel inyectable, de forma típica un polisacárido tal como ácido hialurónico o carboximetilcelulosa. Los implantes en forma de partículas producen su efecto mediante la inducción de una respuesta a cuerpo extraño ante las partículas que da lugar a la encapsulación de fibroblastos de las partículas y a la producción de colágeno - aumentando el volumen del tejido debido a acumulación adicional del tejido.

Un problema de los enfoques actuales referentes a agentes de aumento del volumen de los tejidos es que no permiten el suministro de biomateriales que se basan o incorporan proteínas de longitud completa o proteínas de longitud sustancialmente completa. Las formulaciones que están basadas o incorporan material proteico de longitud completa, o longitud sustancialmente completa, similar al que se halla de forma natural en el cuerpo, son más propensas a mantener los niveles de biocompatibilidad y autorreconocimiento deseables para muchas de las aplicaciones previstas. Se muestra un ejemplo en WO2010/053918, que describe una composición inyectable que comprende una matriz de gelatina con partículas dispersas de elastina reticulada y ácido hialurónico. El proceso de reticulación química da lugar de forma típica a reticulaciones intramoleculares sustanciales que puede romper la estructura natural de la molécula; las técnicas de micronización u homogeneización utilizadas para permitir la inyección del producto no favorecen el mantenimiento de una estructura molecular de proteína de longitud completa, o de longitud sustancialmente completa. Además, se sabe que los agentes de reticulación química utilizados para reticular el ácido hialurónico y las proteínas son tóxicos y pueden causar irritación, inflamación o comportar riesgos cancerígenos.

La presente descripción se refiere, en parte, a proporcionar formulaciones inyectables de biomateriales continuos que están basados o se derivan de proteínas, y permitir que los residuos de proteína incorporados mantengan su estructura de longitud completa, o de longitud sustancialmente completa, y permiten también la protección de los residuos de proteína frente a una rápida resorción y/o degradación debida, p. ej., a la proteólisis. Además, la presente descripción se refiere, en parte, a biomateriales basados, y derivados de, proteínas de longitud completa, o longitud sustancialmente completa, que son aptas para la inyección mediante aguja, retienen una estructura consistente, están suficientemente reticuladas para una lenta resorción in vivo o combinaciones de los mismos. Además, la presente descripción se refiere, en parte, a biomateriales que están sustancialmente desprovistos de agentes de reticulación químicos tóxicos. La presente descripción también proporciona, en parte, métodos, sistemas y/o kits para la preparación y/o formulación de al menos una matriz de proteínas reticuladas, que comprende al menos un residuo de proteína y al menos un residuo de agente de reticulación de biomoléculas, en donde al menos una molécula de proteína se reticula con al menos un agente de reticulación de biomoléculas para formar la matriz de proteínas reticuladas. Además, la presente descripción también proporciona, en parte, sistemas y/o kits para la preparación y/o formulación de al menos una matriz de proteínas reticuladas, que comprende al menos un residuo de proteína y al menos un residuo de polisacárido, en donde las moléculas de proteína, tales como

moléculas de proteína de longitud sustancialmente completa o moléculas de proteína de longitud completa, se reticularan con agentes de reticulación de polisacáridos para formar la al menos una matriz de proteínas reticuladas. Se necesitan las composiciones, métodos, sistemas y/o kits descritos en la presente memoria.

## 5 Resumen

En determinadas realizaciones, en un aspecto, la presente invención se refiere a una composición inyectable, que comprende al menos una matriz de proteínas reticulada, en donde la al menos una matriz de proteínas reticuladas comprende:

- i) entre 1-250 mg/ml de al menos un residuo de proteína derivado de al menos una proteína portadora de amina;
- ii) al menos un residuo que contiene sacárido derivado de al menos una molécula de reticulación que contiene sacárido, que comprende uno o más grupos carboxilo; y
- iii) al menos una reticulación intermolecular que comprende un enlace amida entre una amina del al menos un residuo de proteína y un grupo carboxilo de la al menos una molécula de reticulación que contiene sacárido;

en donde el al menos un residuo de proteína es:

- a) una proteína de longitud completa o una proteína de longitud sustancialmente completa; y
- b) sustancialmente desprovista de reticulaciones intramoleculares.

En determinadas realizaciones, la composición inyectable puede ser una composición sustancialmente soluble en un medio acuoso y/o fisiológico. En determinadas realizaciones, la composición inyectable puede ser sustancialmente soluble, parcialmente soluble o sustancialmente insoluble en un medio acuoso y/o fisiológico.

En toda la invención, la molécula de reticulación que contiene sacárido comprende uno o más grupos carboxilo.

En determinadas realizaciones, la composición inyectable puede comprender al menos un residuo que contiene sacárido derivado de al menos una molécula de reticulación que contiene sacárido que puede ser sustancialmente biodisponible, sustancialmente biodegradable, sustancialmente bioabsorbible, y/o sustancialmente biorresorbible. En determinados aspectos, el al menos un residuo que contiene sacárido puede comprender al menos un residuo polisacárido, al menos un residuo oligosacárido o combinaciones de los mismos. En determinados aspectos, la composición inyectable puede comprender al menos un polisacárido, en donde el al menos un residuo polisacárido comprende un residuo polisacárido de bajo, medio, y/o alto peso molecular. En determinados aspectos, la composición inyectable puede comprender al menos un residuo polisacárido que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 500 a aproximadamente 500.000 Daltons. En determinados aspectos, la composición inyectable puede comprender al menos un residuo que contiene sacárido, que comprende al menos un residuo polisacárido o al menos un residuo oligosacárido que comprende uno o más grupos funcionales con carga negativa y/o uno o más grupos funcionales con carga positiva. En determinados aspectos, la composición inyectable puede comprender al menos un residuo de polisacárido polianiónico o al menos un residuo de oligosacárido polianiónico. En determinados aspectos, la composición inyectable puede comprender al menos un residuo polisacárido que se deriva de o comprende el residuo de ácido hialurónico, un derivado de celulosa, carboxicelulosa, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilamilosa, goma xantano, goma guar,  $\alpha$ -glucano,  $\beta$ -glucano,  $\beta$ -1,4-glucano,  $\beta$ -1,3-glucano, alginatos, carboximetildextrano, un derivado de glicosaminoglicano, condroitín-6-sulfato, sulfato de dermatina, heparina, sulfato de heparina, o biomateriales tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poli(láctico-co-glicólico), fosfato tricálcico, 1-hidroxiapatita, y/o las sales, derivados, y/o combinaciones farmacéuticamente aceptables de los mismos. En determinados aspectos, la composición inyectable puede comprender al menos una matriz de proteínas reticuladas que comprende al menos un residuo que contiene sacárido en una concentración de entre aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 30 %.

En determinadas realizaciones, la composición inyectable puede comprender al menos un residuo de proteína que se deriva o comprende el residuo de una proteína de longitud completa. En determinados aspectos, la composición inyectable puede comprender al menos un residuo de proteína que comprende un residuo de cadena lateral portador de amina, que comprende al menos un residuo lisina y/o al menos un residuo arginina. En determinados aspectos, la composición inyectable puede comprender al menos un residuo de proteína que se deriva o comprende el residuo de tropoelastina, elastina, albúmina, colágeno, monómeros de colágeno, inmunoglobulinas, insulina y/o derivados o combinaciones de los mismos.

En determinadas realizaciones, la composición inyectable puede comprender al menos una matriz de proteínas reticuladas que es extrudible a al menos o aproximadamente 10 cm. En determinadas realizaciones, la composición inyectable es extrudible. En determinadas realizaciones, la composición inyectable es extrudible a una longitud de entre aproximadamente 5 cm a aproximadamente 30 cm. En determinadas realizaciones, la composición inyectable puede comprender al menos una matriz de proteínas reticuladas que comprende aproximadamente o al menos

aproximadamente 25 mg/ml de residuo de proteína. La composición inyectable comprende al menos una matriz de proteínas reticuladas que comprende entre aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml de residuo de proteína.

5 En determinadas realizaciones, la composición inyectable puede comprender al menos una matriz de proteínas reticuladas que se prepara empleando: i) un agente de activación y/o un agente de acoplamiento; y ii) un agente modificador y/o un agente de acoplamiento auxiliar; para formar una o más uniones y/o reticulaciones.

10 En determinadas realizaciones, la composición inyectable se puede emplear terapéuticamente, lo que comprende en cirugía, estética, aumento del volumen de los tejidos, tratamiento de la incontinencia, en productos de sustitución dérmica, dermatología, cirugía dermatológica, cirugía ocular, reumatología, farmacología, y/o en el campo de los productos cosméticos.

15 Un método de preparación de una composición inyectable, que comprende al menos una matriz de proteínas reticuladas, en donde la al menos una matriz de proteínas reticuladas comprende:

i) al menos un residuo de proteína derivado de al menos una proteína portadora de amina;

20 ii) al menos un residuo que contiene sacárido derivado de al menos una molécula de reticulación que contiene sacárido, que comprende uno o más grupos carboxilo; y

iii) al menos una reticulación intermolecular que comprende un enlace amida entre la amina de la al menos una proteína portadora de amina y el grupo carboxilo de la al menos una molécula de reticulación que contiene sacárido;

25 en donde la reticulación comprende:

1) modificar la al menos una molécula que contiene sacárido de modo que comprenda al menos un grupo químico reactivo;

30 2) combinar la al menos una molécula que contiene sacárido modificada con la al menos una proteína portadora de amina, en donde la al menos una proteína portadora de amina comprende un grupo químico reactivo complementario al grupo reactivo en la al menos una molécula que contiene sacárido modificada; y

3) formar la al menos una reticulación intermolecular entre la al menos una proteína portadora de amina y la al menos una molécula que contiene sacárido modificada.

35 En determinados aspectos, la al menos una molécula que contiene sacárido modificada puede comprender una molécula de polisacárido modificada que se ha preparado uniendo al menos un resto que comprende un enlazador reactivo capaz de conjugarse con una molécula de proteína o molécula de proteína modificada durante la síntesis de polisacárido en fase sólida. En determinados aspectos, el al menos un resto puede unirse mediante un enlace covalente. Además, el al menos un resto puede comprender un grupo espaciador. Además, el grupo espaciador puede comprender óxido de etileno polimerizado. El grupo espaciador puede también ser PEG o PEO.

40 En determinadas realizaciones, los métodos descritos pueden ser, robustos, más eficaces, rentables, simples y/o combinaciones de los mismos.

45 En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede comprender uno o más residuos de proteína o residuos de proteína modificados. En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede comprender dos residuos de proteína o residuos de proteína modificados diferentes.

50 En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede comprender uno o más residuos de polisacárido o residuos de polisacárido modificados. En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede comprender dos residuos de polisacárido o residuos de polisacárido modificados diferentes.

55 En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede ser una composición inyectable.

### Breve descripción de los dibujos

60 Los dibujos adjuntos facilitan la comprensión de las diversas realizaciones de esta descripción. A continuación se describirán con mayor detalle realizaciones ilustrativas de procesos, sistemas, kits, preparaciones, métodos, purificaciones, o combinaciones de los mismos, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas en las que:

La figura 1 ilustra, según determinadas realizaciones, una estructura repetitiva ideal de ácido hialurónico. El ácido hialurónico es un polisacárido que consiste en unidades de disacárido ácido  $\beta$ -D-glucurónico-[1,3]- $\beta$ -D-N-acetil-glucosamina, que comprenden un grupo carboxilo por unidad de disacárido, que pueden estar activadas y reticuladas.

La figura 2 ilustra, según determinadas realizaciones, una reacción mediada por EDC y NHS con una molécula que contiene carboxilato (1) y una amina (2). Las estructuras intermedias posibles ilustradas incluyen un éster de O-acilisourea y un intermedio de éster de NHS, formado a partir de un agente modificador, tal como N-hidroxisuccinimida (NHS), para formar un intermedio carboxilato activado de NHS que es capaz de reaccionar con un grupo amino primario (1) para formar un enlace amida.

La figura 3 ilustra, según determinadas realizaciones, un gel SDS PAGE de proteína extraída de la formulación del ejemplo 5 que se ha remojado en PBS, que contiene las siguientes franjas: Marcador (franja M); Sobrenadante (franjas A y B); y TE puro (franja TE).

### Descripción detallada

La siguiente descripción se proporciona en relación con varias realizaciones que pueden tener características y particularidades comunes.

Salvo que se definan de otro modo, los términos técnicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado habitualmente entendido por el experto en la técnica.

El término “activado” puede incluir una forma intermedia de una molécula que puede ser susceptible y/o vulnerable a ataque nucleófilo y/o sustitución nucleófila por parte de un compuesto nucleofílico. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, una molécula que contiene grupo carboxilo, tal como una molécula que contiene sacárido que comprende un grupo carboxilo, por ejemplo, un polisacárido que comprende un grupo carboxilo, puede ser activada cuando, por ejemplo, se trata con un agente de activación para formar un producto intermedio activado, tal como un éster activado, en donde el producto intermedio activado puede ser susceptible y/o vulnerable a un ataque nucleófilo y/o sustitución nucleófila por parte de un compuesto nucleófilo, tal como una amina, para formar una unión entre la molécula que contiene grupo carboxilo y el compuesto nucleófilo, tal como una unión de amida. En determinadas realizaciones, una molécula que contiene hidroxilo, tal como una molécula que contiene sacárido que comprende un grupo hidroxilo, por ejemplo, un polisacárido que comprende un grupo hidroxilo, puede ser activada cuando, por ejemplo, se trata con un agente de activación para formar un producto intermedio activado, tal como un epoxi o un grupo reactivo halohidrina, en donde el producto intermedio activado puede reaccionar con un compuesto, tal como una amina, para formar una unión entre la molécula que contiene grupo hidroxilo y el compuesto, tal como una unión de amina secundaria o terciaria.

El término “aminoácido” puede referirse a los  $\alpha$ -aminoácidos que son racémicos, ya sea con la configuración D o L. En determinadas realizaciones, un aminoácido puede ser un aminoácido natural o un aminoácido no natural, tal como un aminoácido no natural obtenido por síntesis. La designación “d” previa a la designación de un aminoácido (p. ej., dAla, dSer, dVal, etc.) se refiere al isómero D del aminoácido. La designación “dl” previa a la designación de un aminoácido (p. ej., dlSer) se refiere a una mezcla de los isómeros L y D del aminoácido.

El término sustancia “biocompatible”, puede incluir la capacidad de un material para actuar con una respuesta de huésped apropiada en una situación específica, por ejemplo, que no presente efectos tóxicos médicamente inaceptables o perjudiciales para la función biológica.

El término “bioconjugado” puede referirse a un conjugado derivado de al menos dos biomoléculas, de al menos dos biopolímeros, o de al menos una biomolécula y al menos otro biopolímero. El bioconjugado puede también incluir un conjugado derivado de tres o más biomoléculas, biopolímeros y/o combinaciones de los mismos, de modo que al menos una de las biomoléculas y/o biopolímeros se conjuga con más de una biomolécula y/o biopolímero, teniendo de este modo reticulaciones intermoleculares. El bioconjugado puede también incluir una o más uniones entre los componentes individuales que se han conjugado, tal como una reticulación intramolecular. En determinadas realizaciones, el bioconjugado pueden tener una o más reticulaciones intermoleculares, por ejemplo, el bioconjugado puede estar reticulado únicamente de forma intermolecular, o puede estar reticulado sustancial o predominantemente de forma intermolecular. En determinadas realizaciones, el bioconjugado pueden tener una o más reticulaciones intramoleculares, por ejemplo, el bioconjugado puede estar reticulado únicamente de forma intramolecular, o puede estar reticulado sustancial o predominantemente de forma intramolecular. En determinadas realizaciones, el bioconjugado pueden tener tanto reticulaciones intermoleculares como reticulaciones intramoleculares. El bioconjugado también puede incluir uno o más grupos espaciadores entre la una o más uniones que unen el uno o más componentes individuales, o el grupo espaciador puede estar entre el componente individual y la unión. Por ejemplo, el grupo espaciador puede incluir, aunque no de forma limitativa, un resto óxido de etileno, un polímero formado de restos repetitivos  $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)$ , polietilenglicol (PEG), poli(óxido de etileno), y/o derivados de los mismos.

El término “biomolécula” puede referirse a un compuesto hallado en la naturaleza, un derivado de un compuesto hallado en la naturaleza (es decir, una molécula natural), un análogo modificado por síntesis de un compuesto hallado en la naturaleza, un análogo genéticamente modificado de un compuesto hallado en la naturaleza, o un análogo genéticamente modificado de un compuesto hallado en la naturaleza. Por ejemplo, una biomolécula puede incluir, aunque no de forma limitativa, un aminoácido, péptido, péptido bioactivo, péptido genéticamente modificado, proteína, glicoproteína, proteína bioactiva, proteína parcialmente digerida, proteínas en su forma proactiva, proteína genéticamente modificada, enzima, anticuerpo, anticuerpo genéticamente modificado, sacárido, disacárido, trisacárido, oligosacárido, polisacárido,

oligonucleótido, ARN, ADN, ácido peptidonucleico (APN), antígeno, oligosacárido, sustrato para una enzima, sustrato para un receptor nuclear, y/o derivados o combinaciones de los mismos.

El término “biopolímero” puede referirse a un compuesto hallado en la naturaleza, un derivado de un compuesto hallado en la naturaleza, un análogo modificado por síntesis de un compuesto hallado en la naturaleza, un análogo genéticamente modificado de un compuesto hallado en la naturaleza, o un análogo genéticamente modificado de un compuesto hallado en la naturaleza, en donde el biopolímero puede estar constituido por unidades monoméricas. Por ejemplo, los biopolímeros pueden incluir, aunque no de forma limitativa, péptidos, ácidos peptidonucleicos (APN), oligonucleótidos, ARN, ADN, proteínas, enzimas, anticuerpos, glicoproteínas, trisacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, y/o derivados de los mismos. En determinadas realizaciones, el biopolímero puede ser lineal o ramificado, o puede ser de un diseño tridimensional particular, tal como una estructura de *starburst* (explosión estelar), o estructura de tipo matriz. Los ejemplos de unidades monoméricas incluyen, aunque no de forma limitativa, aminoácidos, derivados de aminoácidos, monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, derivados de azúcar, monómeros de APN, nucleótidos, nucleósidos y/o derivados o combinaciones de los mismos.

En determinadas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente memoria pueden contener centros quirales. Dichos centros quirales pueden ser de la configuración (R) o (S), o pueden ser mezclas de los mismos. Por ejemplo, los compuestos proporcionados en la presente memoria pueden ser enantioméricamente puros, diastereoméricamente puros o estereoisoméricamente puros. En determinadas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente memoria pueden ser mezclas estereoisoméricas o mezclas diastereoméricas. Por ejemplo, en el caso de residuos de aminoácidos, cada residuo puede ser de la forma L o D. Por ejemplo, la configuración preferida de residuos de aminoácidos naturales es la L.

La expresión “grupos reactivos complementarios” representa los grupos que, al reaccionar entre ellos, forman una unión covalente. Por ejemplo, un grupo reactivo amino puede referirse a un resto que puede reaccionar directamente con un resto que contiene partes reactivas a amina para formar un enlace amida o un enlace amina. Por ejemplo, un grupo reactivo tiol puede referirse a un resto que puede reaccionar directamente con un grupo que contiene sulfhidrilo reactivo para formar un enlace sulfuro estable. Por ejemplo, un grupo amino puede ser complementario a un derivado carboxilo. Por ejemplo, un grupo amino puede ser complementario a un derivado hidroxilo. Por ejemplo, un grupo hidrazino puede ser complementario a un derivado carboxilo. Por ejemplo, un grupo oxiamino también puede ser complementario a un derivado carbonilo.

El término “conjugado” puede representar un compuesto que contiene al menos dos o más componentes que están unidos entre sí, tales como al menos dos o más biomoléculas y/o biopolímeros que están unidos entre sí. Los componentes individuales pueden estar unidos directamente a través de uno o más enlaces covalentes, uno o más enlaces iónicos, por quelación, y/o mezclas o combinaciones de uniones de los mismos. En determinadas realizaciones, el conjugado puede comprender uniones directas entre los componentes individuales, tales como enlaces iónicos, enlaces covalentes, por ejemplo, enlaces amida, con unión conjunta directa de las al menos dos o más biomoléculas y/o biopolímeros. Por ejemplo, el conjugado puede comprender un primer componente, tal como una proteína, que puede estar unido directamente a través de uno o más enlaces covalentes a un segundo componente, tal como un polisacárido, para formar un conjugado, p. ej., un conjugado proteína-polisacárido. En determinadas realizaciones, el conjugado puede comprender un grupo espaciador entre los componentes individuales, en donde el conjugado comprende al menos dos uniones mediante el grupo espaciador para unir los dos componentes individuales entre sí. Por ejemplo, una primera biomolécula puede formar una primera unión con un grupo espaciador y una segunda molécula biomolécula puede formar una segunda unión con el grupo espaciador. El conjugado puede incluir uno o más grupos espaciadores entre la una o más uniones del uno o los más componentes individuales, o puede estar entre el componente individual y la unión. Por ejemplo, el grupo espaciador puede incluir, aunque no de forma limitativa, un resto glicol, un resto óxido de etileno, un polímero formado de restos repetitivos  $-(CH_2-CH_2-O)-$ , tales como polietilenglicol (PEG), poli(óxido de etileno), una poliamina, un poliol, y/o derivados o combinaciones de los mismos.

La expresión “matriz de proteínas reticuladas” se refiere a uno o más residuos de proteína que comprenden al menos una o más reticulaciones con al menos uno o más residuos de molécula, como se define en las reivindicaciones.

El término “residuo” puede referirse a la parte de material molecular o material molecular residual que permanece en un producto de reacción. Por ejemplo, la parte de material molecular de proteína que permanece en un producto de reacción, tal como un producto reticulado derivados de la reacción de una molécula de proteína y un agente de reticulación, se denomina residuo de proteína. Por ejemplo, la parte de material molecular que contiene sacárido que permanece en un producto de reacción, tal como un producto reticulado derivado de la reacción de una molécula que contiene sacárido y una molécula de proteína, se denomina residuo que contiene sacárido.

Los términos “aguja fina” o “aguja de calibre fino” o “inyección con aguja fina” pueden referirse, aunque no de forma limitativa, al uso de una aguja de un tamaño de aproximadamente 25 G o menor. También pueden utilizarse agujas de mayor calibre en determinadas aplicaciones como se describe adicionalmente en la presente memoria.

El término “ácido hialurónico” o “HA” puede incluir ácido hialurónico y cualquiera de sus sales hialuronato, incluido, por ejemplo, hialuronato de sodio (la sal sódica), hialuronato de potasio, hialuronato de magnesio y hialuronato de

calcio. En la presente memoria se puede usar ácido hialurónico de diversas fuentes. Por ejemplo, el ácido hialurónico puede ser extraído de tejidos de origen animal, cosechado como un producto de fermentación bacteriana, o producido en cantidades comerciales mediante tecnología de procesos biotecnológicos.

El término “unión” puede referirse a la conexión o enlace entre dos componentes moleculares individuales que están unidos entre sí. En determinadas realizaciones, los componentes moleculares individuales que pueden unirse entre sí pueden incluir, aunque no de forma limitativa, biopolímeros, biopolímeros modificados, tales como biopolímeros modificados por métodos biológicos y/o por síntesis, biomoléculas, biomoléculas modificadas, tales como biomoléculas modificadas por métodos biológicos y/o por síntesis. Por ejemplo, la conexión o enlace entre dos biomoléculas, entre una biomolécula y un grupo espaciador, entre dos biopolímeros, entre un biopolímero y un grupo espaciador, entre dos moléculas modificadas, y/o derivados o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, la unión puede ser estable a termólisis o hidrólisis, o ambas. En determinadas realizaciones, la unión puede ser biocompatible. En determinadas realizaciones, la unión se puede formar mediante la formación de un enlace covalente, un enlace iónico y/o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la unión se puede formar mediante la formación de una combinación de uno o más enlaces covalentes y/o uno o más enlaces iónicos. En la presente invención, como se define en las reivindicaciones, la unión covalente se limita a la formación de un enlace amida.

El enlace amida se forma entre un grupo ácido carboxílico o un resto de ácido carboxílico activado de una biomolécula que contiene sacárido y un grupo amina de una proteína que contiene un aminoácido, por ejemplo, una proteína que comprende un residuo lisina. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el enlace amida puede ser entre, por ejemplo, una biomolécula que comprende un resto sacárido modificado, tal como un resto polisacárido modificado con un grupo espaciador y una biomolécula que comprende un resto aminoácido, tal como una proteína. En determinadas realizaciones, el enlace amida puede ser entre, por ejemplo, una biomolécula que comprende un resto sacárido y una biomolécula que comprende un resto aminoácido modificado, tal como una proteína modificada con un grupo espaciador.

El término “modificado” puede referirse a una modificación de una molécula y/o un resto en la molécula, tal como una biomolécula o un biopolímero, ya sea mediante procesos naturales, modificaciones químicas sintéticas, bioingeniería o similares, y/o combinaciones o variaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, la molécula y/o resto en la molécula puede modificarse por medio de la transformación de un resto ya existente en la molécula, tal como por procesos de transformación química sintética y/o mediante procesos naturales, la unión de un resto adicional y/o combinaciones o variaciones de los mismos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la unión de un resto a la molécula puede ser mediante la formación de un enlace covalente. En determinadas realizaciones, por ejemplo, la molécula modificada que comprende un resto transformado, puede ser capaz o más capaz de reaccionar con un grupo reactivo complementario para formar una unión, una reticulación, y/o combinaciones o derivados de los mismos. En determinadas realizaciones, por ejemplo, la molécula modificada que comprende un resto unido, puede ser capaz o más capaz de reaccionar con un grupo reactivo complementario para formar una unión, una reticulación, y/o combinaciones o derivados de los mismos. En determinadas realizaciones, la molécula modificada que comprende el resto transformado y/o unido puede incluir, por ejemplo, un grupo reactivo, un grupo reticulable, un grupo espaciador, un grupo reactivo complementario y/o combinaciones o derivados de los mismos. En determinadas realizaciones, la molécula modificada que comprende el resto transformado y/o unido, puede comprender un resto, tal como un grupo reactivo, que puede formarse y/o desprotegerse mediante modificaciones químicas sintéticas o mediante procesos naturales para estar disponible para reaccionar para formar una unión o reticulación, por ejemplo, reaccionando con un grupo reactivo complementario. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la molécula modificada puede obtenerse accionando un grupo químico, tal como un grupo carboxilo, uniendo un grupo espaciador, desprotegiendo un resto reactivo, y/o combinaciones o variaciones de los mismos.

Los términos “mol” o “concentración molar (M)” de los polisacáridos, como se utilizan en la presente memoria, se refieren a los moles de la unidad monomérica repetitiva contenida dentro del polímero.

El término “polisacárido” puede incluir, por ejemplo, una molécula que contiene sacárido que comprende al menos tres residuos sacárido, por ejemplo, al menos tres unidades repetitivas de monómero sacárido, tales como al menos tres unidades repetitivas monosacárido, al menos tres unidades repetitivas disacárido, al menos tres unidades repetitivas trisacárido, al menos tres unidades repetitivas oligosacárido, y/o combinaciones o derivados de las mismas. En determinadas realizaciones, un polisacárido puede comprender residuos sacáridos iguales y/o diferentes, por ejemplo, uno o más de los mismos y/o diferentes residuos sacárido, dos o más de los mismos y/o diferentes residuos sacáridos, tres o más de los mismos y/o diferentes residuos sacáridos, y/o combinaciones o derivados de los mismos.

La expresión “molécula que contiene sacárido” puede incluir, por ejemplo, una molécula que comprende un monosacárido, un disacárido, un trisacárido, un oligosacárido y/o un polisacárido. En determinadas realizaciones, por ejemplo, la molécula que contiene sacárido puede comprender una unidad repetitiva monomérica que comprende un monosacárido, un disacárido, un trisacárido, un oligosacárido o un polisacárido. En determinadas realizaciones, la molécula que contiene sacárido puede comprender una o más de las mismas o diferentes unidades repetitivas monoméricas de sacárido, por ejemplo, la molécula que contiene sacárido puede comprender uno o más de las mismas o diferentes unidades repetitivas monoméricas de disacárido, trisacárido, oligosacárido y/o polisacárido.

En determinadas realizaciones, el residuo que contiene sacárido puede derivarse de un oligosacárido, oligosacárido modificado, polisacárido, polisacárido modificado, y/o derivados de los mismos, o puede derivarse de una molécula

de reticulación que contiene sacárido, por ejemplo, un reticulante con oligosacárido, reticulante con oligosacárido modificado, reticulante con polisacárido, reticulante con polisacárido modificado, y/o derivados de los mismos.

El término “proteína” o “unidad de proteína” o “monómero de proteína” puede incluir, por ejemplo, una proteína de longitud completa, una proteína de longitud sustancialmente completa, una proteína bioactiva, una proteína en forma proactiva, una proteína inactiva, una proteína que comprende un sitio activo, una proteína que comprende un sitio de enlace, una proteína que comprende un sitio de clivaje proteolítico, una proteína parcialmente digerida, una proteína parcialmente hidrolizada, una proteína que comprende una o más mutaciones de punto único, una proteína que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 99,99 % de proteína de longitud completa, una proteína que comprende la conservación de aproximadamente 50 % a aproximadamente 99,99 % de los aminoácidos en una proteína de longitud completa. En determinadas realizaciones, la proteína puede incluir, por ejemplo, un péptido que comprende al menos una secuencia de péptido bioactivo, un péptido que comprende al menos un sitio de enlace del receptor, un péptido que comprende al menos un sitio de clivaje proteolítico, un oligopéptido, un polipéptido y/o combinaciones o derivados de los mismos.

En determinadas realizaciones, la proteína puede incluir, por ejemplo, una proteína que comprende al menos un residuo lisina, al menos un residuo arginina, al menos un residuo cisteína, al menos un residuo serina, al menos un residuo treonina, al menos un residuo tirosina, al menos un residuo glutamato, al menos un residuo aspartato, al menos un residuo prolina, y/o combinaciones o derivados de los mismos. En determinadas realizaciones, la proteína puede incluir, por ejemplo, una proteína que comprende al menos un residuo dimérico, tal como al menos un residuo cistina.

La proteína incluye una proteína que comprende al menos un grupo amina, una proteína que comprende al menos una cadena lateral portadora de amina, una proteína que comprende al menos un residuo aminoácido portador de amina, tal como una proteína que comprende al menos un residuo de lisina, una proteína que comprende al menos un residuo de arginina y/o combinaciones o derivados de los mismos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la proteína puede incluir una proteína que comprende una región rica en amina, tal como una región rica en lisina o una región rica en arginina y/o combinaciones o derivados de los mismos. En determinadas realizaciones, la proteína puede incluir, por ejemplo, una proteína de poli(residuo de amina), tal como una polilisina, poliarginina y/o combinaciones o derivados de las mismas.

En determinadas realizaciones, una proteína puede incluir homopolímeros o copolímeros, por ejemplo, homopolímeros o copolímeros de residuos aminoácido. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la proteína puede comprender un homopolímero o copolímero de residuos lisina, residuos arginina y/o residuos histidina, tales como una proteína que comprende una región rica en lisina. En determinadas realizaciones, por ejemplo, la proteína que comprende una región rica en lisina puede comprender al menos dos unidades lisina, comprendiendo por ejemplo una región de polilisina, por ejemplo, que comprende al menos 5 unidades lisina. En determinadas realizaciones, por ejemplo, la proteína que comprende una región rica en arginina puede comprender al menos dos unidades arginina, comprendiendo por ejemplo una región de poliarginina, por ejemplo, que comprende al menos 5 unidades arginina. En determinadas realizaciones, la proteína puede comprender al menos dos regiones ricas en residuos diferentes, por ejemplo, una proteína que comprende al menos una región rica en lisina y al menos una región rica en arginina y/o combinaciones o derivados de las mismas. En determinadas realizaciones, la proteína puede incluir, aunque no de forma limitativa, tropoelastina, elastina, albúmina, colágeno, monómeros de colágeno, inmunoglobulinas, insulina, y/o derivados o combinaciones de los mismos.

En determinadas realizaciones, una proteína puede incluir una proteína modificada o derivado de proteína. En determinadas realizaciones, por ejemplo, una proteína modificada o derivado de proteína puede ser una proteína preparada a partir de y/o derivada de o mediante procesos naturales, modificación química sintética, y/o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, por ejemplo, una proteína modificada o derivado de proteína puede ser una proteína preparada a partir de y/o derivada de o mediante procesos naturales, tales como los que se producen en células eucariotas, células procariotas y/o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los procesos naturales pueden incluir, síntesis de proteínas, degradación de proteínas, hidrólisis, procesamiento enzimático y/o conjugación, oxidación, reducción, glicosilación, aminación, carboxilación, incorporación de un residuo aminoácido o grupo espaciador (algunas veces denominado grupo de unión), modificación y/o derivatización de un residuo aminoácido o grupo espaciador y/o combinaciones o variaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, por ejemplo, una proteína modificada o derivado de proteína puede ser una proteína preparada a partir de y/o derivada de o mediante modificación química sintética. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la modificación química sintética puede incluir oxidación, reducción, conjugación, hidrólisis, aminación, esterificación, amidación, aminación reductora, activación del grupo carboxilo, modificación del grupo carboxilo, incorporación de un residuo de aminoácido o grupo espaciador (algunas veces denominado grupo de unión), modificación y/o derivatización de un residuo de aminoácido o grupo espaciador y/o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, la proteína modificada o derivado de proteína se pueden preparar mediante síntesis de fase sólida, síntesis de fase de solución, y/o combinaciones de las mismas. En determinadas realizaciones, una proteína o derivado de proteína modificado se puede preparar a partir de una proteína que comprende una región rica en residuos aminoácido portadores de amina, tal como una región rica en lisina.

En determinadas realizaciones, el residuo de proteína puede derivarse de una proteína y/o derivados de las mismas como se describe en la presente memoria.



El término “grupo espaciador” puede incluir, por ejemplo, un resto que une uno o más componentes individuales, por ejemplo, la unión de una proteína y un polisacárido.

- 5 El término “molécula sintética” puede referirse a una molécula pequeña o un polímero que no se obtiene naturalmente; por ejemplo, una molécula sintética se prepara mediante modificación química vía síntesis de fase sólida, síntesis de fase de solución o combinaciones de las mismas.

10 Determinadas realizaciones proporcionan métodos para modificar o derivatizar una molécula que contiene sacárido, tal como un polisacárido, con un grupo químico capaz de formar un enlace covalente cuando se combina con una proteína. El polisacárido puede ser modificado de modo que pueda seguir siendo soluble, o suficientemente soluble, en agua y/o solución salina. La mayoría de los reactivos restantes después de la modificación del polisacárido se eliminan mediante, por ejemplo, precipitación o filtración. La molécula que contiene sacárido modificado, tal como un polisacárido, puede utilizarse a continuación como agente de reticulación. Una solución del polisacárido modificado puede mezclarse a continuación con la proteína o proteínas necesarias y dejarse reaccionar. Los grupos químicos modificados del polisacárido modificado reaccionan con la proteína para formar los biomateriales. Los biomateriales producidos de este modo tienen algunas propiedades únicas cuando se comparan con biomateriales producidos utilizando enfoques convencionales. Por ejemplo, las formulaciones producidas a partir de proteínas reticuladas utilizando sustancias químicas que dan lugar a reticulaciones intramoleculares son de forma típica opacas y tienen a menudo una coloración blanca con tintes de amarillo o marrón. Las formulaciones obtenidas con determinados métodos descritos son formulaciones incoloras transparentes. Además, las proteínas reticuladas con sustancias químicas, p. ej., glutaraldehído, pueden tener sustancia química residual remanente en la formulación, lo que puede causar inflamación in vivo y/o reducir la biocompatibilidad del producto. Las formulaciones obtenidas con determinados métodos descritos están sustancialmente desprovistas de tales sustancias químicas residuales.

- 25 Las formulaciones producidas utilizando reticulantes químicos o moléculas de reticulación cortas a menudo dan lugar a biomateriales que deben ser micronizados u homogeneizados para permitir su suministro utilizando jeringas o agujas; o, requieren el mantenimiento del nivel de reticulación a un nivel mínimo para permitir la extrusión con aguja. Las proteínas reticuladas con sustancias químicas, p. ej., glutaraldehído, que están demasiado reticulados no se pueden extrudir a través de agujas de calibre fino.

30 Las formulaciones preparadas mediante determinados métodos descritos pueden ser extrudidas a través de agujas de calibre fino sin un procesamiento adicional, o procesamiento adicional sustancial. Determinadas formulaciones descritas mantienen una cohesividad suficiente incluso después de la extrusión con aguja de modo que se pueden extrudir hebras suficientemente largas de material desde la aguja sin romper el material (p. ej., >10 cm, >12 cm, >15 cm, >18 cm, >20 cm, etc.). Además, utilizando determinadas realizaciones descritas en la presente memoria, las formulaciones basadas en proteínas de longitud completa y en las que se utiliza un polisacárido modificado como agente de reticulación producen una estructura de matriz flexible que permite producir biomateriales bastante firmes que conservan no obstante suficiente flexibilidad para permitir la eyección a través de agujas de calibre fino.

#### 40 Matriz de proteínas reticuladas

La matriz de proteínas reticuladas puede variar en las realizaciones descritas.

- 45 Por ejemplo, la matriz de proteínas reticuladas puede derivarse de la reticulación de una o más moléculas de proteína, tales como una o más proteínas de longitud completa, con una o más moléculas que contienen sacárido, tales como una o más moléculas que contienen sacárido modificado.

50 Por ejemplo, la matriz de proteínas reticuladas puede incluir uno o más residuos de proteína que están reticulados con uno o más residuos que contienen sacáridos, tales como una proteína reticulada con sacárido, una proteína reticulada con disacárido, una proteína reticulada con trisacárido, una proteína reticulada con oligosacárido o una proteína reticulada con polisacárido.

55 La matriz de proteínas reticuladas puede incluir, por ejemplo, una o más uniones entre uno o más residuos de proteína mediante una o más uniones a uno o más residuos de polisacárido, por ejemplo, uno o más residuos de proteína puede(n) conectarse o enlazarse entre sí a través de una o más uniones a uno o más residuos que contiene(n) sacárido. La matriz de proteínas reticuladas puede incluir, por ejemplo, al menos un residuo de proteína unido a al menos un residuo que contiene sacárido, tal como un residuo oligosacárido o un residuo polisacárido, mediante uno o más enlaces covalentes y, opcionalmente, uno o más enlaces iónicos.

60 La matriz de proteínas reticuladas puede incluir, por ejemplo, uniones, es decir, una o más reticulaciones, por ejemplo, una o más reticulaciones intermoleculares y/o una o más reticulaciones intramoleculares o mezclas o combinaciones de las mismas. La matriz de proteínas reticuladas puede estar intermolecularmente reticulada, reticulada de forma sustancialmente intermolecular, intramolecularmente reticulada, reticulada de forma sustancialmente intramolecular, y/o reticulada tanto de forma intermolecular como intramolecular. La matriz de proteínas reticuladas puede derivarse de uno o más reticulantes, tales como un reticulante que contiene sacárido, por ejemplo, un polisacárido o polisacárido modificado, tal como ácido hialurónico o ácido hialurónico modificado. Por ejemplo, la matriz de proteínas reticuladas

puede derivarse de uno o más reticulantes, y uno o más reticulantes pueden unirse y/o reticularse a una o más moléculas de proteína y/o formar una o más uniones con la misma molécula de proteína. Por ejemplo, la matriz de proteínas reticuladas puede comprender una estructura de matriz, por ejemplo, una matriz de residuos de proteína unida y/o reticulada, a uno o más residuos reticulantes que contienen sacárido. La estructura de matriz de una matriz de proteínas reticuladas puede proporcionar flexibilidad, en donde el grado de reticulación dentro de la matriz de proteínas reticuladas puede alterar la flexibilidad proporcionada.

En determinadas realizaciones, el uso de una matriz de proteínas reticuladas derivada de una proteína de longitud completa sustancialmente desprovista de reticulaciones intramoleculares como se describe en la presente memoria puede dar lugar a una formulación que es más compatible con los tejidos, mejora el crecimiento interno de los tejidos, mejora el nuevo crecimiento de los tejidos, o combinaciones de los mismos. Esta formulación puede también ser remodelada en estructuras más típicas y deseables y/o incorporada en el tejido nuevo.

En determinadas realizaciones, el uso de una matriz de proteínas reticuladas derivada de una proteína de longitud sustancialmente completa sustancialmente desprovista de reticulaciones intramoleculares como se describe en la presente memoria puede dar lugar a una formulación que es más compatible con los tejidos, mejora el crecimiento interno de los tejidos, nuevo crecimiento de los tejidos, o combinaciones de los mismos. Esta formulación puede también ser remodelada en estructuras más típicas y deseables y/o incorporada en el tejido nuevo.

Otras realizaciones descritas en la presente memoria pueden tener un cierto grado de reticulación intramolecular en el residuo de proteína de la matriz de proteínas reticuladas sin dejar de proporcionar suficientes propiedades como para ser aceptables para su uso.

En determinadas realizaciones, el uso de una matriz de proteínas reticuladas derivada de una proteína de longitud sustancialmente completa en donde la estructura del residuo de proteína no es sustancialmente enmascarada por el proceso de realización puede dar lugar a una formulación que es más compatible con los tejidos, mejora el crecimiento interno de los tejidos, nuevo crecimiento, o combinaciones de los mismos. Esta formulación puede también ser remodelada en estructuras más típicas y deseables y/o incorporada en el tejido nuevo.

Grado de reticulación

En determinadas realizaciones, la solubilidad del agente de reticulación que contiene sacárido, tal como un agente de reticulación con polisacárido, puede mantenerse utilizando una relación particular de reactivos químicos utilizados durante la modificación, derivatización, y/o la manipulación del polisacárido. En determinadas realizaciones, para garantizar que el polisacárido derivatizado no se reticula consigo mismo, pueden ser necesarias determinadas precauciones durante el proceso posterior a la derivatización. Por ejemplo, puede ser necesario el procesamiento razonablemente rápido del HA derivatizado después de su precipitación con el fin de retirar mediante lavado los reactivos restantes. En determinadas realizaciones, la precipitación del HA derivatizado, el lavado de los reactivos, y la resuspensión en una solución de agua pueden efectuarse en aproximadamente 30 minutos. Se pueden utilizar otros períodos de tiempo dependiendo de cada situación en particular. Por ejemplo, la precipitación del HA derivatizado, el lavado de los reactivos, y la resuspensión en una solución de agua puede efectuarse en al menos 20, 30, 40, 50 minutos, 1 hora o 2 horas.

En determinadas realizaciones, también puede ser útil dividir adicionalmente el precipitado de HA derivatizado en trozos más pequeños antes de la disolución para aumentar la velocidad de disolución que puede durar varias horas, por ejemplo, al menos 1, 2, o 3 horas. Una vez disuelto puede ser deseable, en determinadas aplicaciones, utilizar el polisacárido derivatizado en un período de tiempo determinado, por ejemplo, en el transcurso de al menos 1, 2, 3, 4 o 24 horas. Sin embargo, esto puede no ser necesario y dependerá de cada formulación y/o aplicación en particular.

En determinadas realizaciones, la molécula de proteína utilizada para formar la matriz de proteínas reticuladas en la formulación puede verse limitada por la necesidad de tener grupos reactivos adecuados para poder ser reticulada por el agente de reticulación con polisacárido.

En determinadas realizaciones, al menos aproximadamente 50 % del monómero de proteína puede reticularse con una molécula que contiene sacárido, por ejemplo, un oligosacárido, polisacárido, o derivados de los mismos. En otras realizaciones, al menos o aproximadamente 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % del monómero de proteína puede estar reticulado con una biomolécula y/o biopolímero o derivados de los mismos. En determinadas realizaciones, el monómero de proteína puede estar sustancial o completamente reticulado con una biomolécula y/o biopolímero.

En determinadas realizaciones, el número de reticulaciones por sitios de reticulación posibles por polisacárido puede ser al menos de 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 50 %.

En determinadas realizaciones, el número de unidades de proteína o monómeros de proteína no incorporados en el complejo o matriz de proteínas reticuladas y que permanecen no unidas, puede ser de al menos 1, 3, 5, 7, 9, 10 %, 15 % o 20 %. En determinadas aplicaciones es deseable minimizar el porcentaje de unidades de proteína que permanecen no unidas después de la formación del complejo o matriz de proteínas reticuladas. Por ejemplo, en determinadas

aplicaciones puede ser deseable tener menos de 20 %, 15 %, 10 %, 7 %, 5 %, 3 %, o 1 % de las unidades de proteína no unidas en la formulación después de la reticulación. La ausencia de unidades de proteína o de monómeros de proteína no unidos es una de las ventajas de determinadas aplicaciones de la presente descripción.

5 Los porcentajes pueden depender de varias consideraciones, incluidas, aunque no de forma limitativa, la proteína seleccionada y el tipo de química seleccionada para cada aplicación en particular. Por ejemplo, para los enlaces de tropoelastina y lisina el número de sitios posibles en algunas aplicaciones es, de forma típica, de alrededor de 30 a alrededor de 35, de modo que la relación podría ser de 1-35 (o de alrededor de 3 % a 100 %). Con respecto a esta combinación, los porcentajes preferidos para la matriz de proteínas reticuladas puede ser de al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % del número de sitios posibles en la una o más moléculas de proteína están reticulados con una o más biomoléculas y/o biopolímeros, tales como moléculas que contienen sacárido, o derivados de las mismas.

10 Otra consideración es la longitud de la molécula que contiene sacárido, tal como polisacáridos, y la química utilizada para la activación, derivatización, o modificación. Por ejemplo, en determinadas aplicaciones se pueden activar del 1 a 30 %, de 1 a 40 %, de 3 a 30 %, o de 5 a 30 % del uno o más grupos ácido carboxílico en un grupo carboxilo en el oligosacárido o polisacárido con un agente de activación, tal como NHS para formar de 1 a 30 %, de 1 a 40 %, de 3 a 30 %, o de 5 a 30 % sitios éster activados que están disponibles para su reticulación con la proteína. Por ejemplo, en determinadas aplicaciones del 1 al 30 %, del 1 al 50 %, del 3 al 30 %, o del 5 al 30 % del uno o más grupos hidroxilo en el oligosacárido o polisacárido se pueden activar con un agente de activación, tal como alilglicidil éter y modificar adicionalmente con un haluro, tal como bromo, para formar de 1 a 30 %, de 1 a 40 %, de 3 a 30 %, de 5 a 30 % o de 1 a 50 % de sitios epoxi o halohidrina activados que están disponibles para su reticulación con la proteína. También se pueden usar otras sustancias químicas que son más o menos eficaces. Otra consideración es mantener bajo el porcentaje de unidades de proteína que pueden mantenerse como monómero (es decir, no unidas), por ejemplo, 5 % o menos.

25 En determinadas realizaciones, el monómero de proteína se puede reticular con molécula que contiene sacárido de modo que se puede incorporar en la formulación de entre aproximadamente 40 % a aproximadamente 99 % del monómero de proteína. En otras realizaciones, el monómero de proteína se puede reticular de modo que se puede incorporar en la formulación de entre aproximadamente 30 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 60 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 70 % a aproximadamente 99 %, de 80 % a aproximadamente 100 %, o de aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 % del monómero de proteína.

35 En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede tener resistencia aceptable a la biodegradación, degradación, termólisis, hidrólisis y/o combinaciones de las mismas durante un período de tiempo. En determinadas realizaciones, una formulación que comprende una matriz de proteínas reticuladas puede tener resistencia aceptable a la biodegradación, degradación, termólisis, hidrólisis y/o combinaciones de las mismas durante un período de tiempo. Dependiendo de la matriz de proteínas reticuladas ese período de tiempo puede ser de al menos 1, 2, 3, 6, 9 o 12 meses. Dependiendo de la formulación que comprende una matriz de proteínas reticuladas ese período de tiempo puede ser de al menos 1, 2, 3, 6, 9 o 12 meses.

40 En determinadas realizaciones, una formulación que comprende una matriz de proteínas reticuladas puede permanecer aceptablemente intacta y/o persistir durante un período de 1 semana a 1 año in vivo. Dependiendo de cada formulación en particular, el período de tiempo puede variar. Por ejemplo, la formulación que comprende una matriz de proteínas reticuladas puede persistir durante al menos de 1 a 4 semanas, 2-8 semanas, 1-3 meses, 1-6 meses, 3-9 meses o 6-12 meses, de 1 semana a 24 meses, o de 12 meses a 24 meses. En determinadas realizaciones, la formulación que comprende una matriz de proteínas reticuladas puede persistir in vivo durante al menos 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, o 24 meses.

50 Por ejemplo, en determinadas realizaciones, una formulación que comprende una proteína reticulada, tal como un implante de 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, o 0,5 ml, 1 ml, 2 ml o 3 ml, puede persistir durante un período de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 años in vivo.

55 En determinadas realizaciones, el componente de matriz de proteínas reticuladas dentro de una formulación puede ser estable a la termólisis, resistente a la termólisis, estable a la hidrólisis, resistente a la hidrólisis, o combinaciones de los mismos durante el almacenamiento de la formulación. Por ejemplo, la formulación puede ser estable durante al menos 6, 12 o 24 meses en almacenamiento a una temperatura de aproximadamente 2-8 °C. El componente de matriz de proteínas reticuladas dentro de una formulación puede ser estable a la termólisis, resistente a la termólisis, estable a la hidrólisis, resistente a la hidrólisis, o combinaciones de los mismos durante el almacenamiento de la formulación; si se liofiliza y almacena a una temperatura apropiada, por ejemplo, a menos de o a aproximadamente -10 °C, entonces puede ser estable durante varios años. El componente de matriz de proteínas reticuladas dentro de una formulación puede ser estable y/o resistentes a termólisis y/o hidrólisis durante el almacenamiento de la formulación a temperatura ambiente durante al menos 1, 2, 3, 4 semanas, 1, 2, 6 o 12 meses. En determinadas realizaciones, el componente de matriz de proteínas reticuladas dentro de una formulación puede ser estable y/o resistente a la termólisis y/o hidrólisis durante el almacenamiento a temperatura ambiente durante entre al menos de 1 semana a 12 meses, de 2 semanas a 8 meses, de 1 semana a 5 semanas, o de 1 mes a 6 meses.

## Matrices de proteínas reticuladas homólogas y heterólogas

La matriz de proteínas reticuladas puede variar en términos de estructura y composición. La matriz de proteínas reticuladas puede incluir, por ejemplo, una matriz de proteínas reticuladas que comprende uno o más residuos de proteína homogéneos u homólogos reticulados con una o más moléculas que contienen sacárido homogéneas u homólogas. Una matriz de proteínas reticuladas puede comprender uno o más residuos de proteína homólogos reticulados con uno o más residuos que contienen sacárido heterogéneos o heterólogos. La matriz de proteínas reticuladas puede comprender uno o más residuos de proteína reticulados con uno o más residuos diferentes que contienen sacárido, tales como uno o más residuos diferentes con oligosacárido o polisacárido, y/o combinaciones de los mismos. La matriz de proteínas reticuladas puede comprender uno o más residuos de proteínas reticulados con una mezcla de uno o más residuos de polisacárido diferentes, tal como una combinación o mezcla de residuos de ácido hialurónico y residuos de carboximetilcelulosa. La matriz de proteínas reticuladas se puede preparar a partir de la reticulación de una o más moléculas de proteína con una mezcla de uno o más polisacáridos activados diferentes, tales como una combinación o mezcla de ácido hialurónico activado y carboximetilcelulosa activada.

La matriz de proteínas reticuladas puede incluir, por ejemplo, una matriz de proteínas reticuladas que comprende un residuo de proteínas heterólogo, por ejemplo, dos o más residuos de proteína diferentes, reticulados con residuos de molécula que contienen sacárido homólogos. La matriz de proteínas reticuladas puede incluir, por ejemplo, una matriz de proteínas reticuladas que comprende un residuo de proteínas heterólogo, por ejemplo, dos o más residuos de proteína diferentes, reticulados con un residuo que contienen sacárido heterólogos. La proteína reticulada puede comprender uno o más residuos de proteína diferentes, por ejemplo, dos o más residuos de proteína diferentes, reticulados con un residuo que contiene sacárido, tal como un oligosacárido o un residuo polisacárido.

Por ejemplo, la matriz de proteínas reticuladas puede comprender uno o más residuos de proteína diferentes, por ejemplo, dos o más residuos de proteína diferentes, reticulados con uno o más residuos diferentes que contienen sacárido, por ejemplo, uno o más residuos de oligosacárido diferentes y/o uno o más residuos de polisacárido diferentes, tales como dos o más residuos de oligosacárido diferentes y/o dos o más residuos de polisacárido diferentes, o mezclas o combinaciones de los mismos.

Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede comprender un residuo de proteína reticulado con uno o más residuos que contienen sacárido diferentes, por ejemplo, dos o más residuos que contienen sacárido diferentes, por ejemplo uno o más residuos de oligosacárido diferentes y/o uno o más residuos de polisacárido diferentes, tales como dos o más residuos de oligosacárido diferentes y/o dos o más residuos de polisacárido diferentes, o mezclas o combinaciones de los mismos.

La matriz de proteínas reticuladas puede incluir, por ejemplo, uno o más residuos de proteína por residuo de polisacárido, tales como dos o más residuos de proteínas por residuo de polisacárido. La matriz de proteínas reticuladas puede incluir, por ejemplo, uno o más residuos de polisacárido por residuo de proteína, tales como dos o más residuos de polisacárido por residuo de proteína. En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede incluir, por ejemplo, una relación de aproximadamente 0,1 %-1,5 % de residuo de polisacárido a aproximadamente 2,5 %-10 % de residuo de proteína. Otros ejemplos de relaciones son: de 0,75 %-1,5 % de residuo de polisacárido a 3 %-6 % de residuo de proteína; de 0,1 %-1,5 % de residuo de polisacárido a 0,1 %-6 % de residuo de proteína; de 0,25 %-0,85 % de residuo de polisacárido a 1 %-4 % de residuo de proteína; de 0,1 %-3 % de residuo de polisacárido a 0,5 %-15 % de residuo de proteína; de menos de o igual a 3 % de residuo de polisacárido a al menos 0,5 % de residuo de proteína; al menos 0,25 % de residuo de polisacárido hasta un valor inferior o igual a 15 % de residuo de proteína; al menos 0,01 % de residuo de polisacárido hasta un valor inferior o igual a 12 % de residuo de proteína; o al menos 1 % de residuo de polisacárido hasta un valor inferior o igual a 8 % de residuo de proteína. Se pueden usar otras relaciones y dependerán de las propiedades deseadas y de la estructura de la molécula de proteína utilizada para obtener la matriz de proteínas reticuladas. Por ejemplo, en formulaciones más blandas, la cantidad de molécula de polisacárido usada puede reducirse. Por ejemplo, en determinadas formulaciones en las que se utilizan sacáridos de cadena más larga pueden permitir el uso de una menor cantidad de molécula de polisacárido y aun así producir formulaciones aceptables.

En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede comprender un material biocompatible y/o biodisponible. Por ejemplo, la matriz de proteínas reticuladas puede ser y/o derivarse de un material biocompatible y/o biodisponible; o la matriz de proteínas reticuladas puede ser biocompatible y/o biodisponible.

En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede comprender y/o derivarse de un reticulante soluble en agua, por ejemplo, un reticulante que contiene sacárido soluble en agua o un reticulante que contiene sacárido modificado soluble en agua, tal como un reticulante oligosacárido soluble en agua o un reticulante oligosacárido modificado soluble en agua. La matriz de proteínas reticuladas puede también comprender y/o derivarse de un reticulante que contiene polisacárido soluble en agua o un reticulante que contiene polisacárido modificado soluble en agua.

En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede incluir un conjugado de proteína de molécula que contiene sacárido, tal como un conjugado de proteína de sacárido, un conjugado de proteína de disacárido, un

conjugado de proteína de trisacárido, un conjugado de proteína de oligosacárido, un conjugado de proteína de polisacárido, y/o combinaciones de los mismos.

#### Molécula que contiene sacárido

En determinadas realizaciones, la molécula que contiene sacárido, tal como un oligosacárido, puede comprender uno o más disacáridos, uno o más trisacáridos, dos o más trisacáridos, dos o más trisacáridos, tres o más disacáridos, tres o más trisacáridos y/o combinaciones o derivados de los mismos. Por ejemplo, un oligosacárido puede comprender al menos o aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 11 residuos o unidades de sacárido. Un oligosacárido utilizado para derivar la matriz de proteínas reticuladas, en determinadas formulaciones, puede comprender también entre aproximadamente 3 a aproximadamente 15, de 3 a aproximadamente 14, de aproximadamente 3 a aproximadamente 12, de aproximadamente 3 a aproximadamente 11, de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, de aproximadamente 4 a aproximadamente 15, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 residuos o unidades de sacárido.

En determinadas realizaciones, el polisacárido puede comprender una o más unidades o residuos de disacárido, una o más unidades o residuos de trisacárido, uno o más oligosacáridos; dos o más unidades o residuos de disacárido, dos o más unidades o residuos de trisacárido, dos o más oligosacáridos; dos o más unidades o residuos de disacárido, tres o más unidades o residuos de trisacárido, tres o más oligosacáridos, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un polisacárido puede comprender al menos o aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 800, 1.000, 1.200, 1.500, 2.000, 5.000, 10.000, o 20.000 unidades o residuos de sacárido. Un polisacárido utilizado para derivar la matriz de proteínas reticuladas, en determinadas formulaciones, puede comprender también entre aproximadamente 25 a aproximadamente 5.000, de 500 a aproximadamente 2.000, de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 5.000, de aproximadamente 150 a aproximadamente 250, de aproximadamente 175 a aproximadamente 225, de aproximadamente 100 a aproximadamente 175, de aproximadamente 150 a aproximadamente 200, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 residuos o unidades de sacárido.

En determinadas realizaciones, puede utilizarse HA en el intervalo de aproximadamente 100 a 300 unidades o residuos de sacárido, por ejemplo alrededor de 200 unidades o residuos de sacárido. En otras realizaciones, puede utilizarse HA en el intervalo de 200 a 20.000 unidades o residuos monosacárido. En otras realizaciones, puede utilizarse HA en el intervalo de aproximadamente 500 a 2.000 unidades o residuos de sacárido. En otras realizaciones, puede utilizarse HA en el intervalo de 3.000 a 5.000 unidades o residuos de monosacárido. En otras formulaciones, el HA utilizado puede comprender al menos o aproximadamente 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 500, 800, 1.000, 1.200, 1.500, 2.000, 5.000, 10.000, o 20.000 unidades o residuos de sacárido. El HA utilizado para derivar la matriz de proteínas reticuladas, en determinadas formulaciones, puede comprender también entre aproximadamente 25 a aproximadamente 5.000, de 500 a aproximadamente 2.000, de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 5.000, de aproximadamente 150 a aproximadamente 250, de aproximadamente 175 a aproximadamente 225, de aproximadamente 100 a aproximadamente 175, de aproximadamente 150 a aproximadamente 200, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 residuos o unidades de sacárido.

La molécula que contiene sacárido, tal como un polisacárido, puede ser de bajo, medio o alto peso molecular. Por ejemplo, la composición o formulación puede derivarse de un polisacárido o agente de reticulación con polisacárido de bajo, medio, o alto peso molecular.

La molécula que contiene sacárido de bajo peso molecular puede comprender un peso molecular de entre aproximadamente 25.000 a aproximadamente 300.000 Daltons, por ejemplo, entre aproximadamente 50.000 a aproximadamente 275.000 Daltons, de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 250.000 Daltons, o de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 300.000 Daltons. La molécula que contiene sacárido de peso molecular medio puede comprender un peso molecular de entre aproximadamente 300.000 a aproximadamente 900.000 Daltons, de aproximadamente 600.000 a aproximadamente 800.000 Daltons, de aproximadamente 500.000 a aproximadamente 900.000 Daltons, o de aproximadamente 500.000 a aproximadamente 750.000 Daltons. La molécula que contiene sacárido de alto peso molecular puede comprender un peso molecular de entre aproximadamente 900.000 a aproximadamente 4.000.000 Daltons, de aproximadamente 1.000.000 a aproximadamente 3.500.000 Daltons, de aproximadamente 900.000 a aproximadamente 3.500.000 Daltons, de aproximadamente 1.500.000 a aproximadamente 3.700.000 Daltons, o de aproximadamente 1.250.000 a aproximadamente 3.000.000 Daltons. También se contempla poder utilizar polisacáridos que tengan intervalos de pesos moleculares que combinen los intervalos proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, se puede utilizar un polisacárido que tenga un intervalo de peso molecular de aproximadamente 25.000 a aproximadamente 750.000, de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 900.000, de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 750.000, o de aproximadamente 250.000 a aproximadamente 500.000 Daltons. También pueden seleccionarse otros intervalos.

En determinadas realizaciones, la capacidad de usar polisacáridos de bajo peso molecular a medio peso molecular hace que estos enfoques sean más fáciles desde una perspectiva de fabricación/procesamiento. Por ejemplo, el uso de HA de bajo peso molecular permite modificar, precipitar y lavar el HA y el HA permanece como una solución de una viscosidad razonablemente baja que puede ser fácilmente utilizada como agente de reticulación. El uso de polisacáridos de alto peso molecular puede ocasionar problemas de manejo adicionales (p. ej., solución viscosa,

problemas con mezclado, aireación, etc.) pero, en determinadas realizaciones, se puede utilizar una amplia gama de pesos moleculares para lograr los resultados deseados. Un enfoque para manejar polisacáridos de alto peso molecular puede ser utilizar una solución más diluida. Por ejemplo, (p. ej., utilizar HA de 1.500.000 Daltons pero utilizar una solución al 0,1 % para mantener baja la viscosidad).

La matriz de proteínas reticuladas puede comprender el residuo que contiene sacárido, tal como un residuo polisacárido, en una concentración de entre aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 15 %. En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede comprender el residuo que contiene sacárido en una concentración de entre aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 0,25 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 3,5 %, de aproximadamente 0,20 % a aproximadamente 3 %, de aproximadamente 0,25 % a aproximadamente 3 %, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 4 %, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 3 %, de aproximadamente 0,75 % a aproximadamente 3,5 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 3 %, de aproximadamente 1,5 % a aproximadamente 3,5 %, o de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 4 %.

La molécula que contiene sacárido, tal como un polisacárido, puede comprender un peso molecular de al menos o de aproximadamente 500 Daltons, por ejemplo, un peso molecular de al menos o de aproximadamente 5.000, 10.000, 25.000, 50.000, 100.000, 150.000, 200.000, 200.000, 250.000, 300.000, 500.000, 750.000 o 1.500.000 Daltons.

En determinadas realizaciones, una proteína o una molécula que contiene sacárido, por ejemplo, un oligosacárido o un polisacárido, puede comprender, al menos, un resto reticulable, tal como un grupo carboxilo, o una amina.

En determinadas realizaciones, un resto reticulable, tal como un resto reticulable, puede ser un resto que puede activarse, por ejemplo, un resto de grupo carboxilo, de modo que la activación del resto que puede unirse permite y/o facilita una reacción con un grupo reactivo complementario en el mismo y/o una segunda molécula para formar una unión, tal como un enlace covalente, con la misma y/o la segunda molécula, por ejemplo, formar una reticulación con una segunda molécula, tal como una segunda biomolécula o biopolímero.

En determinadas realizaciones, una molécula que contiene sacárido o una proteína, puede comprender de forma adicional, un grupo espaciador, de modo que el grupo espaciador puede unirse a la misma molécula y/o a una segunda molécula, por ejemplo, una segunda biomolécula o biopolímero. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un grupo espaciador puede comprender al menos uno o más restos que pueden unirse permitiendo de este modo la unión del grupo espaciador a la misma y/o a una segunda molécula. En determinadas realizaciones, por ejemplo, una molécula, tal como una molécula o proteína que contiene sacárido, puede comprender un grupo espaciador que comprende al menos uno o más restos reticulables, permitiendo de este modo que la molécula forme una unión, tal como una reticulación, con una segunda molécula, tal como una segunda biomolécula o biopolímero, por ejemplo, una proteína o una molécula que contiene sacárido, por medio de una unión formada por el resto que se puede unir en el grupo espaciador. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la molécula que contiene sacárido, tal como un oligosacárido, polisacárido o polisacárido modificado, puede comprender un grupo espaciador que comprende al menos uno o más restos que se pueden unir, tales como un grupo carboxilo o un grupo carboxilo activado o modificado, permitiendo de este modo que el polisacárido forme una unión, tal como una reticulación, con una segunda molécula, tal como una proteína, por ejemplo, una proteína que comprende una amina, a través de una unión de amida formada por el resto que se puede unir en el grupo espaciador del oligosacárido, polisacárido o polisacárido modificado.

En determinadas realizaciones, la molécula que contiene sacárido, tal como un oligosacárido o un polisacárido, puede comprender de forma adicional grupos funcionales con carga negativa o grupos funcionales con carga positiva, por ejemplo, un oligosacárido que comprende grupos funcionales con carga negativa o grupos funcionales con carga positiva; o un polisacárido que comprende grupos funcionales con carga negativa o grupos funcionales con carga positiva; y/o derivados o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la molécula que contiene sacárido, tal como un oligosacárido o un polisacárido, puede comprender un ácido idurónico, ácido glucurónico o un residuo N-acetilglucosamina. En determinadas realizaciones, por ejemplo, la molécula que contiene sacárido puede incluir, por ejemplo, un oligosacárido que comprende un grupo carboxilo o un polisacárido que comprende un grupo carboxilo, tal como un ácido policarboxílico que contiene polisacárido, por ejemplo, ácido hialurónico o carboximetilcelulosa; un oligosacárido que comprende un grupo amina o un polisacárido que comprende un grupo amina; y/o derivados de los mismos.

#### Características estructurales - lineales o ramificados

En determinadas realizaciones, la molécula que contiene sacárido puede incluir oligosacáridos lineales, oligosacáridos ramificados, polisacáridos lineales y/o polisacáridos ramificados. La molécula que contiene sacárido puede incluir, aunque no de forma limitativa, oligosacáridos y/o polisacáridos, tales como hyaluronic acid (ácido hialurónico - "HA"); un derivado de celulosa, por ejemplo, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa ("HPC"), hidroxipropilmetilcelulosa ("HPMC"), hidroxipropilcelulosacarboximetil amilosa ("CMA"); goma xantano; goma guar;  $\alpha$ -glucano;  $\beta$ -glucano;  $\beta$ -1,4-glucano;  $\beta$ -1,3-glucano; alginatos; carboximetil dextrano; un derivado de glicosaminoglicano; condroitina-6-sulfato; sulfato de dermatina; heparina; sulfato de heparina; polylactic acid (ácido poliláctico - "PLA"); o biomateriales tales como polyglycolic acid (ácido poliglicólico - "PGA"); poly(lactic-co-glycolic

acid (ácido poli(láctico-co-glicólico) - "PLGA"); tricalcium phosphate (fosfato tricálcico (- "TCP")); 1-hydroxyapatite (1-hidroxiapatita (- "PAH")); y/o sus sales o derivados farmacéuticamente aceptables o combinaciones de los mismos. La molécula que contiene sacárido puede incluir una pectina y/o un derivado de la misma, incluidos oligosacáridos y/o polisacáridos lineales y ramificados.

5 La molécula que contiene sacárido puede ser una molécula que contiene sacárido preparada a partir de y/o derivada a partir de o mediante procesos naturales, modificación química sintética, y/o combinaciones de los mismos.

10 Por ejemplo, la molécula que contiene sacárido puede incluir moléculas que contienen sacárido preparadas y/o derivadas de células eucariotas o células procariotas, por ejemplo, procesos naturales que se producen a través de células eucariotas o células procariotas, o combinaciones de las mismas.

15 Por ejemplo, la molécula que contiene sacárido puede incluir moléculas que contienen sacárido preparadas y/u obtenidas mediante modificación química por síntesis, tal como mediante síntesis de fase sólida. La molécula que contiene sacárido incorpora un enlazador durante la síntesis de polisacárido de fase sólida.

20 La molécula que contiene sacárido puede comprender una molécula que contiene sacárido sustancialmente soluble, por ejemplo, totalmente soluble, parcialmente soluble, tal como un oligosacárido o polisacárido que es sustancialmente soluble en una solución acuosa y/o solución fisiológica.

La molécula que contiene sacárido puede comprender, por ejemplo, un sacárido polianiónico, un sacárido policatiónico, una molécula de sacárido biocompatible, un sacárido biodisponible, un sacárido biodegradable, un sacárido bioabsorbible, un sacárido biorresorbible, o combinaciones de los mismos.

## 25 Proteína y polisacárido

En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede incluir, por ejemplo, un componente de residuo que contiene sacárido que tiene carácter de carga electrónica que complementa el carácter de carga electrónica del componente de residuo de proteína en la matriz de proteínas reticuladas. El carácter de complementación de carga de cada componente puede ayudar y/o facilitar el mezclado de los componentes entre sí. El carácter de complementación de carga de cada componente puede ampliar las propiedades generales de la composición. La matriz de proteínas reticuladas puede incluir además contraiones farmacéuticamente y/o fisiológicamente aceptables que pueden complementar un componente de residuo que contiene sacárido que tiene un carácter de carga electrónica, o contraiones farmacéuticamente y/o fisiológicamente aceptables que pueden complementar un carácter de carga electrónica del componente de residuo de proteína, o ambos. Por ejemplo, la matriz de proteínas reticuladas puede comprender un componente de residuo polianiónico que contiene sacárido, tal como un residuo de polisacárido polianiónico reticulado con un residuo de proteína con carga positiva. Por ejemplo, la matriz de proteínas reticuladas puede comprender un componente de residuo policatiónico que contiene sacárido, tal como un residuo de polisacárido policatiónico reticulado con un residuo de proteína con carga negativa.

## 40 Selección de proteína y polisacárido

En determinadas realizaciones, la elección del componente proteico incluido en la matriz de proteínas reticuladas, tal como la tropoelastina, puede basarse en los requerimientos funcionales finales del producto de biomaterial resultante. Por ejemplo, el componente de residuo de proteína incluido en la matriz de proteínas reticuladas puede incluir residuos de proteínas tales como residuos de albúmina o de colágeno. En determinadas realizaciones, la elección del componente de residuo de proteína incluido en la matriz de proteínas reticuladas puede basarse en los requerimientos funcionales finales del producto de biomaterial resultante. En determinadas realizaciones, la elección del componente de residuo de proteína incluido en la matriz de proteínas reticuladas puede basarse en el deseo de incluir una combinación de residuos de proteína en el producto de biomaterial resultante.

En determinadas realizaciones, el componente de residuo de proteína incluido en la formulación de matriz de proteínas reticuladas puede variar en la formulación. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la formulación puede tener de 25-50 mg/ml de residuo de proteína y 1-30 mg/ml del residuo de agente de reticulación con polisacárido. En determinadas realizaciones, el componente de residuo de proteína incluido en la formulación de matriz de proteínas reticuladas puede ser de 1-200 mg/ml; 5-30 mg/ml, 20-100 mg/ml, 50-200 mg/ml, 20-100 mg/ml, 25- 80 mg/ml, 30-60 mg/ml, 40-70 mg/ml, o 25-65 mg/ml. En determinadas realizaciones, el intervalo adecuado de cantidades del componente de residuo de proteína y el intervalo adecuado de cantidades del componente de residuo de polisacárido incluido en la formulación de matriz de proteínas reticuladas pueden ser diferentes dependiendo de los requerimientos de cada aplicación en particular.

## 60 Acoplamiento/conjugación/reticulación

La matriz de proteínas reticuladas se prepara mediante la unión, tal como acoplamiento y/o reticulación, de una proteína que contiene amina, a una molécula que contiene sacárido que comprende un grupo carboxilo, un grupo carboxilo activado, o un grupo carboxilo modificado, tal como un oligosacárido, polisacárido, y/o derivado de los mismos, que comprende un grupo carboxilo, un grupo carboxilo activado, o un grupo carboxilo modificado, para formar una unión de

amida. Por ejemplo, la matriz de proteínas reticuladas se puede preparar acoplando y/o reticulando una proteína, tal como una proteína portadora de un residuo de amina, a un oligosacárido y/o oligosacárido modificado que comprende un grupo carboxilo, un grupo carboxilo activado, o un grupo carboxilo modificado, para formar una unión de amida entre la proteína y el oligosacárido. Por ejemplo, la matriz de proteínas reticuladas se puede preparar acoplando y/o reticulando una proteína, tal como una proteína portadora de un residuo de amina, con un polisacárido y/o polisacárido modificado que comprende un grupo carboxilo, un grupo carboxilo activado, o un grupo carboxilo modificado, para formar una unión de amida entre la proteína y el polisacárido.

En determinadas realizaciones, la formación de una matriz de proteínas reticuladas puede facilitarse, además, mediante el empleo de un agente de activación y/o agente de acoplamiento o el empleo tanto de un agente de activación y/o agente de acoplamiento como de un agente modificador y/o agente de acoplamiento auxiliar para formar una unión y/o una reticulación entre el componente proteico de la proteína reticulada y la segunda molécula de la proteína reticulada, tal como una molécula que contiene sacárido. La matriz de proteínas reticuladas se puede preparar empleando un agente de activación y/o agente de acoplamiento para formar una unión y/o reticulación. Por ejemplo, la matriz de proteínas reticuladas se puede preparar activando uno o más grupos ácido carboxílico en un grupo carboxilo que contiene oligosacárido o polisacárido, tal como ácido hialurónico, con un agente de activación y/o agente de acoplamiento para formar un oligosacárido activado o polisacárido activado, y acoplar y/o reticular el oligosacárido activado o el polisacárido activado a una proteína, tal como una proteína portadora de residuos amina, para formar una unión de amida entre el oligosacárido o polisacárido y la proteína. Como también se describe en la presente memoria, la matriz de proteínas reticuladas se puede preparar activando uno o más grupos hidroxilo en un grupo hidroxilo que contiene oligosacárido o polisacárido, tal como ácido hialurónico, con un agente de activación y/o agente de acoplamiento para formar un oligosacárido activado o polisacárido activado, y acoplar y/o reticular el oligosacárido activado o el polisacárido activado a una proteína, tal como una proteína portadora de residuos amina, para formar una unión de amida entre el oligosacárido o polisacárido y la proteína.

#### Agente de activación/agente de acoplamiento/agente modificador

En determinadas realizaciones, un agente de activación, algunas veces denominado agente de acoplamiento, puede incluir, aunque no de forma limitativa, una diimida, tal como una carbodiimida o una carbodiimida soluble en agua, por ejemplo, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida ("EDC"), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidometiódido ("ETC"), 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida ("CMC"), y/o las sales correspondientes o mezclas de los mismos. El agente de activación puede también incluir, por ejemplo, benzotriazol-1-iloxitris-(dimetilamino)-fosfoniohexafluorofosfato ("reactivo BOP"), hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio, bromotris-(dimetilamino)-fosfoniohexafluorofosfato, y/o las sales haluro correspondientes o mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, un agente de activación, algunas veces denominado agente de acoplamiento, puede incluir, aunque no de forma limitativa, un epóxido, tal como alilglicidil éter o un haloalqueno, tal como cloruro de alilo, y/o las sales correspondientes o mezclas de los mismos.

La matriz de proteínas reticuladas se puede preparar empleando un agente de activación y/o agente de acoplamiento y un agente modificador y/o agente de acoplamiento auxiliar para formar una unión y/o reticulación. Por ejemplo, la matriz de proteínas reticuladas se puede preparar activando uno o más grupos ácido carboxílico en un grupo carboxilo que contiene oligosacárido o polisacárido, tal como ácido hialurónico, con un agente de activación y/o agente de acoplamiento para formar un oligosacárido activado o polisacárido activado, modificando el o los grupos carboxílicos activados en el oligosacárido activado o el polisacárido activado con un agente modificador y/o agente de acoplamiento auxiliar para formar un oligosacárido modificado o polisacárido modificado, y acoplar y/o reticular el oligosacárido modificado o el polisacárido modificado a una proteína, tal como una proteína portadora de residuos amina, para formar una unión de amida entre el oligosacárido o polisacárido y la proteína.

En determinadas realizaciones, un agente modificador, a veces denominado agente de acoplamiento auxiliar, puede incluir, aunque no de forma limitativa, un reactivo que, en presencia de un resto carboxilo y/o hidroxilo activado, tal como un resto carboxilo y/o hidroxilo activado en un polisacárido, reacciona de forma adicional con el carboxilo y/o resto hidroxilo activado para formar una especie modificada que puede ser más estable o tener mayor capacidad de reacción con un nucleófilo. Por ejemplo, el agente modificador, o agente de acoplamiento auxiliar, puede incluir, aunque no de forma limitativa, N-hidroxi-succinimida ("NHS"), N-hidroxisulfosuccinimida ("sulf-NHS"), hidrato de 1-hidroxi-benzotriazol ("HOBT"), monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol, 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazol (HOObt), 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HAT), 4-nitrofenol, 2-nitrofenol, 4-nitrotiofenol, 2-nitrotiofenol, pentaclorofenol, pentafluorofenol, imidazol, tetrazol, 4-dimetilaminopiridina, un haluro y/u otros compuestos relacionados.

En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas se puede preparar activando y/o modificando una molécula que contiene sacárido que comprende uno o más carboxilos, tales como un oligosacárido o un polisacárido, por ejemplo, ácido hialurónico, con un agente de activación y/o un agente modificador, y combinándola con una proteína para formar una o más uniones y/o reticulaciones, tal como una o más uniones de amida, entre la molécula que contiene sacárido y la proteína.

El método de preparación de una matriz de proteínas reticuladas puede comprender mezclar y/o combinar un agente de activación y/o agente modificador con una molécula que contiene sacárido que comprende uno o más



grupos carboxilo, por ejemplo, ácido hialurónico, para formar una molécula que contiene sacárido activada y/o modificada, y mezclar y/o combinar la molécula que contiene sacárido activada y/o modificada con una proteína, para formar una o más uniones y/o reticulaciones, tales como una o más uniones de amida, entre la molécula que contiene sacárido y la proteína. Por ejemplo, una molécula que contiene sacárido que comprende uno o más carboxilos, tales como ácido hialurónico, puede activarse y/o modificarse con un agente de activación, tal como EDC o alilglicidil éter, y/o agente modificador, tal como NHS, HOBt o bromo. Por ejemplo, la molécula que contiene sacárido activada y/o modificada puede comprender uno o más carboxilos activados y/o modificados como ésteres activados y/o modificados, tales como ésteres de triazol activados y/o modificados o como ésteres de N-hidroxisuccinimida activados y/o modificados, epóxidos activados y/o modificados, o halohidrininas activadas y/o modificadas. Una molécula que contiene sacárido que comprende uno o más carboxilos, tales como ácido hialurónico, se puede activar y/o modificar con un agente de activación, tal como EDC o alilglicidil éter, y/o un agente modificador, tal como NHS, HOBt o bromo, y puede combinarse, mezclarse, y/o reaccionar con un compuesto portador de uno o más restos amina, tal como una proteína que comprende una o más cadenas laterales portadoras de amina, para formar una o más uniones y/o reticulaciones, tales como uniones de amida, entre la molécula que contiene sacárido y el compuesto portador de uno o más restos amina.

En determinadas realizaciones, una molécula que comprende uno o más restos amina, tales como una proteína, péptido, o grupo espaciador, que comprende una o más restos amina, puede estar acoplada a uno o más carboxilos en una molécula que contiene sacárido; por ejemplo, puede estar acoplada en un entorno acuoso a un oligosacárido o polisacárido que comprende uno o más grupos carboxilo, tal como un oligosacárido o polisacárido que comprende uno o más grupos carboxilo que han sido activados y/o modificados con un agente de activación y/o agente modificador.

En determinadas realizaciones, el método usado para modificar un polisacárido puede depender de la proteína reticulada y/o el polisacárido utilizado como agente de reticulación. Por ejemplo, el método utilizado para modificar un polisacárido puede comprender el uso de oxidación con peryodato. El método utilizado para modificar un polisacárido puede comprender el uso de un agente de activación, tal como una carbodiimida, por ejemplo, EDC. El método utilizado para modificar un polisacárido puede comprender el uso de un agente de activación, tal como un epóxido, por ejemplo alilglicidil éter. El método utilizado para modificar un polisacárido puede comprender además el uso de un agente modificador, tal como N-hidroxisuccinimida (NHS) o un haluro tal como bromo. Por ejemplo, el ácido hialurónico y/o la carboximetilcelulosa se pueden activar mediante un agente de activación, tal como una carbodiimida, y pueden modificarse adicionalmente mediante un agente modificador, tal como la N-hidroxisuccinimida. Por ejemplo, el ácido hialurónico y/o la carboximetilcelulosa se pueden activar mediante un agente de activación, tal como un epóxido, y pueden modificarse adicionalmente mediante un agente modificador, tal como el bromo.

#### Reactivo molecular bifuncional

En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas se puede preparar haciendo reaccionar una proteína con un reactivo multifuncional, tal como una molécula que contiene sacárido, que comprende dos o más restos reactivos o un grupo espaciador que comprende dos o más restos reactivos, para formar dos o más uniones o reticulaciones. Por ejemplo, el reactivo multifuncional puede comprender dos o más de los mismos o de diferentes restos reactivos, tales como una mezcla de grupos carboxilo y/o hidroxilo, grupos carboxilo y/o hidroxilo activados, grupos carboxilo y/o hidroxilo modificados, y/o combinaciones o derivados de los mismos. Por ejemplo, cada uno de los restos reactivos en el reactivo multifuncional puede ser reactivo con grupos reactivos complementarios sobre la misma u otra molécula. Por ejemplo, uno o más de los restos reactivos en el reactivo multifuncional pueden requerir desprotección, tal como la retirada de un grupo protector, para poder reaccionar con los grupos reactivos complementarios en la misma o en otra molécula.

#### Grupo espaciador

El grupo espaciador puede incluir un resto que se une a uno o más componentes individuales. El grupo espaciador puede estar unido a una o más moléculas, por ejemplo, unido a una proteína mediante un enlace covalente, unido a un polisacárido mediante una unión covalente, unido a una proteína y a un polisacárido mediante enlaces covalentes, y/o combinaciones de los mismos. El grupo espaciador puede incluir, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, un resto glicol, un resto óxido de etileno, un polímero formado de restos repetitivos  $-(CH_2-CH_2-O)-$ , tales como polietilenglicol (PEG), poli(óxido de etileno) (PEO), una poliamina, o un poliol. El espaciador puede ser estable a la termólisis o a la hidrólisis, o a ambas. El espaciador puede ser biocompatible, biodisponible, soluble y/o sustancialmente soluble en medio acuoso y/o fisiológico, o combinaciones de los mismos. La matriz de proteínas reticuladas puede comprender uno o más restos de grupo espaciador, por ejemplo, tales como un grupo polietilenglicol (PEG) o poli(óxido de etileno) (PEO). La molécula que contiene sacárido puede comprender uno o más restos de grupo espaciador, por ejemplo, tales como un polietilenglicol (PEG) o un grupo poli(óxido de etileno) (PEO). La molécula que contiene sacárido puede comprender uno o más restos que incluyen un grupo reactivo, por ejemplo, un grupo reactivo que puede formar un enlace covalente cuando reacciona con un grupo reactivo complementario que puede ser parte de una proteína o proteína modificada. La proteína o proteína modificada puede comprender uno o más restos que incluyen un grupo reactivo, por ejemplo, un grupo reactivo que puede formar un enlace covalente cuando reacciona con un grupo reactivo complementario que puede ser parte de una molécula que contiene sacárido.

## Grado de modificación de polisacárido

En determinadas realizaciones, el reticulante que contiene sacárido, que comprende uno o más carboxilos, por ejemplo, ácido hialurónico, se puede activar y/o modificar de modo que comprenda un intervalo de grupos carboxilo activados y/o modificados y un intervalo de grupos carboxilo que no estén activados y/o modificados. Por ejemplo, el reticulante que contiene sacárido activado y/o modificado puede activarse y/o modificarse de modo que comprenda al menos o aproximadamente 2 % de grupos carboxilo activados y/o modificados, tales como al menos o aproximadamente 0,5 %, 1 %, 3 %, 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % de carboxilo activado y/o modificado. En determinadas aplicaciones, el reticulante que contiene sacárido puede contener grupos carboxilo y/o hidroxilo sustancialmente o completamente activados. En determinadas realizaciones, el reticulante que contiene sacárido activado y/o modificado puede ser activado y/o modificado de modo que comprenda de entre aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 25 %, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 30 %, o de aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 %, grupos carboxilo y/o hidroxilo activados y/o modificados.

En determinadas realizaciones, la variancia en el nivel de grupos activados y/o modificados en el reticulante que contiene sacárido puede aumentar o disminuir la capacidad del reticulante que contiene sacárido de reticularse con una biomolécula. Por ejemplo, el nivel de grupos activados y/o modificados en el reticulante que contiene sacárido puede dar como resultado la formación de una o más conexiones entre el reticulante que contiene sacárido y la biomolécula o el biopolímero. La variancia en el nivel de reticulante que contiene sacárido que comprende grupos activados y/o modificados empleado para preparar la proteína reticulada puede controlar o sustancialmente controlar el número de grupos activados y/o modificados capaces de reaccionar con una biomolécula o biopolímero, tal como la unión y/o la reticulación con una proteína, puede estabilizar o sustancialmente estabilizar la proteína.

## Extrusión

En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede extrudirse a través de una aguja; por ejemplo, extrudirse a través de una aguja de calibre fino. La matriz de proteínas reticuladas puede mantener una cohesividad suficiente, por ejemplo, mantener una cohesividad suficiente incluso después de la extrusión con aguja, de modo que se puede extrudir una hebra más larga desde la aguja sin que se rompa el material. Por ejemplo, de modo que se puede extrudir una hebra de material de al menos aproximadamente 15 cm desde la aguja sin que se rompa el material. La matriz de proteínas reticuladas puede comprender una estructura de matriz flexible. Por ejemplo, la estructura de matriz flexible de la matriz de proteínas reticuladas puede facilitar la producción de biomateriales firmes que mantienen una flexibilidad suficiente para su extracción a través de una aguja fina. En determinadas realizaciones, una formulación que comprende una matriz de proteínas reticuladas se puede extrudir a través de una aguja, por ejemplo, extrudir a través de una aguja de calibre fino sin la necesidad de un procesamiento adicional. En determinadas realizaciones, una formulación que comprende una matriz de proteínas reticuladas puede mantener una capacidad de cohesión suficiente incluso después de extrudir la aguja de modo que se puede extrudir una hebra larga de material desde la aguja sin que el material se rompa, por ejemplo, una hebra de material de al menos aproximadamente 15 cm. En determinadas realizaciones, una formulación puede comprender una matriz de proteínas reticuladas que comprende una estructura de matriz flexible. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la estructura de matriz flexible de la matriz de proteínas reticuladas en la formulación puede facilitar la producción de biomateriales firmes, tales como biomateriales firmes que mantienen la flexibilidad, por ejemplo, una flexibilidad sustancial y/o suficiente, y puede permitir la extracción de la formulación y/o el biomaterial a través de una aguja, por ejemplo, una aguja de calibre fino.

## Métodos de preparación

En determinadas realizaciones, la concentración de un polisacárido en la reacción puede ser de entre aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 %, por ejemplo, de entre aproximadamente 0,25 % a aproximadamente 3 %, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 3 %, o de aproximadamente 0,25 % a 3,5 %.

En determinadas realizaciones, la estequiometría del reactivo puede variar con la química y el polisacárido escogidos. Por ejemplo, para HA:EDC:NHS, la relación puede ser 1:1:1, 1:1:2, 1:1:3, 1:0,5:2, 1:0,5:3. Con NHS, se ha descubierto que la relación 1:1:1 proporciona buenos resultados en términos de incorporación de NHS a un agente de reticulación de tipo polisacárido soluble.

En determinadas realizaciones, la relación molar de polisacárido a agente de activación puede ser de al menos 1:1 a al menos aproximadamente 1:4. En determinadas realizaciones, la relación molar del agente de activación a las unidades de ácido carboxílico del polisacárido puede ser de entre aproximadamente 2 % a aproximadamente 200 %, por ejemplo, de entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 %. En determinadas realizaciones, la relación molar del agente modificador al agente de activación puede ser de entre aproximadamente 1:1 a aproximadamente 3:1, por ejemplo, de entre aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 2,5:1, tal como aproximadamente 2:1.

En determinadas realizaciones, el pH para llevar a cabo la preparación de la reacción reticulante-polisacárido puede ser de al menos 4, 5, 6, 7, 8,0 u 8,5. En determinadas realizaciones, el pH para llevar a cabo la preparación de la reacción

reticulante-polisacárido puede ser de entre aproximadamente 5 a aproximadamente 15, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 7 a aproximadamente 8,6. También pueden utilizarse otros valores de pH.

5 En determinadas realizaciones, el intervalo de temperatura de la reacción de activación, acoplamiento y/o reticulación se lleva a cabo a una temperatura de entre aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C, de 20 °C a aproximadamente 25 °C, o a temperatura ambiente.

10 En determinadas realizaciones, el método de purificación y/o aislamiento del polisacárido derivatizado puede ser robusto, simple, de alto rendimiento, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el método puede proporcionar al menos 40 % de polisacárido derivatizado aislado, con respecto al polisacárido de partida. En otros métodos, el rendimiento puede ser de al menos 40 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de polisacárido derivatizado aislado, con respecto al polisacárido o polisacárido modificado de partida.

#### Usos terapéuticos

15 Las composiciones de matriz de proteínas reticuladas, materiales, formulaciones, métodos de uso, sistemas y/o kits descritos en la presente memoria pueden emplearse en diversos ajustes terapéuticos, incluidos, aunque no de forma limitativa, los empleados en medicina humana o veterinaria, tal como en cirugía. Por ejemplo, se pueden emplear terapéuticamente en cirugía de restauración, cirugía estética, estética, aumento del volumen de los tejidos, tal como en 20 la incontinencia o en productos de sustitución dérmica, dermatología, tales como cirugía dermatológica, cirugía ocular, reumatología, farmacología, o en el campo de la cosmética. Otros usos terapéuticos pueden incluir la hemorragia derivada en cirugía general, reconstrucción de nervios y vasos en cirugía reconstructiva, neurológica y plástica, y trasplantes e injertos de piel de anclaje, vasculares o de cartílagos en cirugía ortopédica, tal como en el tratamiento de la osteoartritis de la rodilla (condición inflamatoria de la rodilla), cirugía vascular y plástica. Determinadas realizaciones pueden ser útiles 25 como vehículos para el suministro de células o moléculas bioactivas, tales como factores de crecimiento para estimular la reparación focalizada; el suministro local de factores de crecimiento en combinación con las composiciones materiales, y/o formulaciones de matriz de proteínas reticuladas, puede facilitar la curación de heridas y la regeneración de tejidos en muchas situaciones, tales como, favorecer la formación ósea, estimular la reparación de cartílago en procedimientos ortopédicos, tratar dolencias debidas a heridas patológicas, tales como úlceras crónicas y/o servir como estructura base para generar tejidos artificiales mediante la proliferación de células autólogas en cultivo. En determinadas realizaciones, la naturaleza inyectable de las composiciones de matriz de proteínas reticuladas, materiales, y/o formulaciones puede hacerlas adecuadas para el aumento de tejidos en cirugía estética, por ejemplo, como material de carga biocompatible inerte, por ejemplo, para el relleno de pliegues dérmicos o para la reconstrucción labial. En determinadas realizaciones, las composiciones, materiales, y/o formulaciones de matriz de proteínas reticuladas pueden ser útiles para el suplemento 35 de una cavidad corporal o un déficit. En determinadas realizaciones, las composiciones, materiales y/o formulaciones de matriz de proteínas reticuladas pueden ser útiles en medicina estética, tratamiento ortopédico, restauración del volumen efundido durante la cirugía, por ejemplo, durante la cirugía ocular, y/o aplicación tópica en tejido saludable o lesionado, tal como la piel, por ejemplo, la aplicación tópica en cosmetología y/o dermatología. En determinadas realizaciones, las composiciones, materiales y/o formulaciones de matriz de proteínas reticuladas pueden ser útiles para rellenar arrugas faciales, líneas finas, tratamiento del “envejecimiento” de la piel, tejido en cicatriz, y/o depresiones de la piel, tales como la lipodistrofia. 40

45 Determinadas realizaciones se pueden utilizar para estabilizar una proteína, por ejemplo, una proteína bioactiva, utilizada para suministrar una o más proteínas estabilizadas, por ejemplo, una o más proteínas bioactivas.

Determinadas realizaciones pueden incluir una sustancia farmacéuticamente activa dispersada y pueden ser útiles como sistema de suministro de medicamentos. Determinadas realizaciones pueden incluir, por ejemplo, proteínas, factores de crecimiento, enzimas, fármacos, biopolímeros, polímeros sintéticos biológicamente compatibles, y/o combinaciones, derivados, o variaciones de los mismos. 50

#### Características; estabilidad

55 En determinadas realizaciones, la matriz de proteínas reticuladas puede comprender al menos una de las siguientes propiedades, incluidas, aunque de forma no limitativa, inyectable, biocompatible, sustancialmente biocompatible, estable, sustancialmente estable, mantiene la bioactividad, mantiene sustancialmente la bioactividad, mantiene la conformación bioactiva, proporciona elasticidad o elasticidad sustancial, un módulo elástico, un módulo viscoso, proporciona rigidez estructural o rigidez sustancial, resistencia o resistencia sustancial al calor, resistencia o resistencia sustancial a la termólisis, resistencia o resistencia sustancial a la biodegradación, puede ser biodegradable, puede no provocar una respuesta a cuerpos extraños o una respuesta a cuerpos extraños pronunciada (*es decir*, autorreconocimiento), tiene un nivel de pureza de al menos aproximadamente 25 %, extrudible, extrudible a través de una aguja, extrudible a través de una aguja de calibre fino. 60

65 En determinadas realizaciones, la composición, material y/o formulación de matriz de proteínas reticuladas puede comprender una molécula que contiene sacárido que tiene al menos una de las siguientes propiedades, incluidas, aunque no de forma limitativa, solubilidad sustancial, solubilidad en agua, sustancialmente soluble en solución acuosa y/o una solución tamponadora acuosa, solubilidad fisiológica, solubilidad fisiológica sustancial, inyectable, biocompatible,

sustancialmente biocompatible, estable, sustancialmente estable, mantiene la bioactividad, mantiene sustancialmente la bioactividad, mantiene la conformación bioactiva, resistencia o resistencia sustancial a la biodegradación, puede ser biodegradable, puede no provocar una respuesta a cuerpos extraños o una respuesta a cuerpos extraños pronunciada (es decir, autorreconocimiento), o tiene un nivel de pureza de al menos aproximadamente 25 %.

5 En determinadas realizaciones, la composición, material y/o formulación de la matriz de proteínas reticuladas puede tener y/o comprender al menos una de las siguientes propiedades, incluidas, aunque de forma no limitativa, inyectable, biocompatible, sustancialmente biocompatible, estable, sustancialmente estable, mantiene la bioactividad, mantiene sustancialmente la bioactividad, mantiene la conformación bioactiva, proporciona elasticidad o elasticidad sustancial, un  
10 módulo elástico, un módulo viscoso, proporciona rigidez estructural o rigidez sustancial, resistencia o resistencia sustancial al calor, resistencia o resistencia sustancial a la termólisis, resistencia o resistencia sustancial a la biodegradación, puede ser biodegradable, puede no provocar una respuesta a cuerpos extraños o una respuesta a cuerpos extraños pronunciada (es decir, autorreconocimiento), tiene un nivel de pureza de al menos aproximadamente 25 %, extrudible, extrudible a través de una aguja, o extrudible a través de una aguja de calibre fino.

15 Algunas realizaciones pueden tener un módulo elástico de entre aproximadamente 500 Pa a aproximadamente 50 Pa, de aproximadamente 450 Pa a aproximadamente 100 Pa, de aproximadamente 400 Pa a aproximadamente 125 Pa; de aproximadamente 400 Pa a aproximadamente 150 Pa, o de aproximadamente 385 Pa a aproximadamente 150 Pa. El módulo elástico variará dependiendo de la concentración y los componentes utilizados. Por ejemplo, para un producto de  
20 matriz de tropoelastina al 4 % reticulada con HA al 1 % el módulo elástico/de almacenamiento es estable en un amplio intervalo de frecuencias alrededor de 80-100 Pa y predomina el material con el módulo de pérdida inicial de alrededor de 5-10 Pa y que aumenta gradualmente con frecuencias angulares crecientes.

25 Determinadas realizaciones pueden tener una longitud extrudible, sustancialmente uniforme y se mantiene sustancialmente sin soporte, de al menos aproximadamente 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm o 25 cm cuando se extrude a través de una aguja de 25 G. Determinadas realizaciones pueden tener una longitud extrudible, que es uniforme y se mantiene sin soporte, de al menos aproximadamente 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm o 25 cm cuando se extrude a través de una aguja de 25 G.

30 Determinadas realizaciones pueden tener una longitud extrudible, que es sustancialmente uniforme y se mantiene sustancialmente sin soporte, de al menos aproximadamente 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm o 25 cm cuando se extrude a través de una aguja de 27 G. Determinadas realizaciones pueden tener una longitud extrudible, que es uniforme y se mantiene sin soporte, de al menos aproximadamente 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm o 25 cm cuando se extrude a través de una aguja de 27 G.

35 Determinadas realizaciones pueden tener una longitud extrudible, que es sustancialmente uniforme y se mantiene sustancialmente sin soporte, de al menos aproximadamente 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm o 25 cm cuando se extrude a través de una aguja de 30 G. Determinadas realizaciones pueden tener una longitud extrudible, que es uniforme y se mantiene sin soporte, de al menos aproximadamente 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm o 25 cm cuando se extrude a través de una aguja de 30 G.

40 Determinadas realizaciones pueden tener una longitud extrudible, que es sustancialmente uniforme y se mantiene sustancialmente sin soporte, de al menos aproximadamente 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm o 25 cm cuando se extrude a través de una aguja de 31 G. Determinadas realizaciones pueden tener una longitud extrudible, que es uniforme y se mantiene sin soporte, de al menos aproximadamente 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm o 25 cm cuando se extrude a través de una aguja de 31 G.

45 Determinadas realizaciones pueden tener una longitud extrudible de al menos aproximadamente 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm, o de 25 cm a través de una aguja de calibre fino. Algunas realizaciones pueden tener una longitud extrudible de entre aproximadamente 5 cm a aproximadamente 30 cm, de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 20 cm; de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 15 cm, o de aproximadamente 15 cm a aproximadamente 30 cm. Determinadas realizaciones pueden tener una longitud extrudible, que es sustancialmente uniforme y se mantiene sustancialmente sin soporte, de al menos aproximadamente 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm o 25 cm a través una aguja de calibre fino. Determinadas realizaciones pueden tener una longitud extrudible, que es uniforme y se mantiene sin soporte, de al menos aproximadamente 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm o 25 cm a través una aguja de calibre fino. Algunas realizaciones pueden tener una longitud extrudible de entre aproximadamente 5 cm a aproximadamente 30 cm, de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 20 cm; de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 15 cm, o de aproximadamente 15 cm a aproximadamente 30 cm, que es sustancialmente uniforme y se mantiene sustancialmente sin soporte cuando se extrude.

60 En determinadas realizaciones, la composición, material y/o formulación de matriz de proteínas reticuladas se puede estabilizar mediante el componente proteico del producto. La estabilidad de la composición, material y/o formulación de matriz de proteínas reticuladas puede obtenerse a partir de una combinación de un residuo de proteína de longitud completa y un componente de residuo de reticulación, tal como un componente de residuo polisacárido. En determinadas  
65 realizaciones, las propiedades de un material final pueden no depender de la viscosidad del componente de residuo de polisacárido, tal como el componente molecular de polisacárido de partida. La composición, material y/o formulación de

matriz de proteínas reticuladas puede estabilizarse mediante el componente de residuo de reticulación del producto, tal como un residuo de reticulación que contiene sacárido, por ejemplo, un residuo reticulante con polisacárido.

5 En determinadas realizaciones, la composición, el material y/o la formulación de matriz de proteínas reticuladas comprende un residuo de proteínas reticuladas biocompatible.

En determinadas realizaciones, la composición, material y/o formulación de matriz de proteínas reticuladas puede ser adecuado(a) para incorporar en una jeringa.

10 En determinadas realizaciones, se pueden utilizar agujas de calibre fino. Por ejemplo, se pueden utilizar agujas de 25 G, 27 G, 29 G, 30 G o 31 G. Sin embargo, se pueden utilizar determinadas realizaciones con agujas de mayor calibre, por ejemplo, de 20 G a 25 G, de 15 G a 25 G, de 15 G a 20 G, de 10 G a 20 G, de 10 G a 15 G, etc. En determinadas realizaciones, el tamaño de la aguja puede depender del material inyectado, por ejemplo, el tipo y/o la consistencia del material inyectado, del deseo de proporcionar una cantidad concreta de volumen de material y/o  
15 combinaciones o variaciones de los mismos. Determinadas realizaciones permiten el uso de agujas de calibre fino en donde la formulación descrita mantiene una cohesividad suficiente después de la extrusión con aguja de modo que se puedan extrudir hebras de material de >15 cm de longitud desde la aguja sin que el material se rompa. Por ejemplo, con determinadas realizaciones se pueden extrudir hebras de material de >15 cm de longitud desde la aguja de 25 G, 27 G, 29 G, o 30 G sin que se rompa el material.

20 Para determinadas aplicaciones, por ejemplo, aplicaciones de aumento de tamaño, tal como, del cuello vesical, puede utilizarse una aguja de 18, 19, 20, 21, 22 o 23 G. En determinadas aplicaciones se pueden utilizar agujas más amplias ya que la longitud de la aguja es mayor (habitualmente varios centímetros (varias pulgadas)) y de este modo el flujo a través de la aguja se ve sometido a una resistencia mayor. En determinadas aplicaciones, el volumen a inyectar puede  
25 aumentarse también en varios mililitros, por ejemplo, al menos 1,5 ml, 2 ml, 2,5 ml, 3 ml, o 4 ml. En determinadas aplicaciones, en donde puede utilizarse un volumen menor, (por ejemplo, "ensartado" (*threading*) o rellenado de arrugas finas o aumento de la piel fina) el volumen utilizado puede ser inferior; por ejemplo, inferior a 2 ml, 1,5 ml, 1,0 ml, 0,75 ml, 0,5 ml o 0,1 ml. Por lo general, en estas aplicaciones se utiliza una aguja de calibre estrecho más corta, por ejemplo, 29 G, 30 G o 31 G que tiene una longitud de 1,27 cm (½ pulgada).

30 El calibre de la aguja y la longitud de la aguja utilizada puede variar en función de cada aplicación y/o formulación en particular. Por ejemplo, las formulaciones con niveles más altos de derivatización (p. ej., 20-30 % de sitios posibles modificados, 1,5 % de polisacárido y 5 % de contenido de proteína) que se pueden usar para proporcionar más soporte de tejido persistente estructural se aplicarían de forma típica utilizando una aguja corta más ancha (tal  
35 como 27 o 25 G x 1,27 cm (½ pulgada) o 2,54 cm (1")). Otro ejemplo sería una formulación con baja derivatización (alrededor de 5 %), bajo contenido en HA (< 1 %) y/o proteína (< 3 %) que se administraría de forma típica a través de una aguja más fina, tal como una aguja de 31 G.

40 En determinadas realizaciones, el material extrudido puede extrudirse sin soporte, habitualmente extrudirse a partir de una superficie inicial en vertical o en un ángulo de 45° desde la vertical. La capacidad de formar hebras de material uniformes puede hacerlo especialmente atractivo para aplicaciones en donde el ensartado del implante se lleva a cabo en la piel en una matriz o red para proporcionar soporte estructural.

45 Se pueden utilizar otros métodos de suministro, por ejemplo, cánulas, catéteres, catéteres poliméricos flexibles, y/o jeringas sin aguja.

En determinadas realizaciones, al menos una de las ventajas de los métodos y/o composiciones, materiales y/o formulaciones de matriz de proteínas reticuladas descritas en la presente memoria, es que la cantidad de proteína que puede incluirse en la formulación de material resultante no es un factor limitante. Por ejemplo, el contenido de residuo de proteína  
50 incluido en la matriz de proteínas reticuladas puede comprender aproximadamente 35 o 40 mg/ml por encima de la cantidad a la cual pueden volverse resistentes a la extrusión con aguja cuando se usan otros métodos de reticulación de proteínas, tales como reticulantes químicos, tales como el glutaraldehído (ya que el material reticulado puede ser bastante denso). El residuo de proteína puede estar sustancial o exclusivamente reticulado de forma intermolecular. La formulación de matriz de proteínas reticuladas puede ser más flexible y/o puede ser inyectada a altas concentraciones de proteína.

55 Las composiciones materiales y/o formulaciones de matriz de proteínas reticuladas descritas en la presente memoria pueden usarse en un kit o envase. Un kit o envase puede comprender una jeringa previamente llenada con la composición de matriz de proteínas reticuladas y un conjunto de agujas o sistemas de suministro de agujas de tamaño adecuado, tales como un sistema de tipo bola rodante (*roller*) con aguja, un sistema de tipo boli de  
60 inyección automática o un sistema de tipo pistola de inyección para mesoterapia. El envase o kit también puede contener instrucciones para inyectar la composición proporcionada. El kit o envase puede comprender al menos una jeringa, al menos un recipiente separado tal como un vial o ampolla que contiene la composición que se va a utilizar, múltiples agujas e instrucciones sobre cómo usar el kit.

65

## Ejemplos

Se proporcionan los siguientes ejemplos y protocolos como realizaciones concretas de la descripción y para demostrar las ventajas de la misma.

Procedimiento para la derivatización de ácido hialurónico (HA) utilizando EDC y NHS:

1. Disolver HA en agua hasta una concentración final de 1 % (posiblemente hasta 2 %).
2. Añadir 1 g de N-hidroxisuccinimida (NHS) por g de HA a derivatizar.
3. Añadir 1 g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) por gramo de HA.
4. Hacer que los reactivos queden completamente disueltos agitando a conciencia (aprox. 10-20 min).
5. Dejar reaccionar durante 60 min a 20-25 °C.
6. Añadir NaCl hasta una concentración final de 1 %.
7. Precipitar el HA derivatizado mediante la adición de 2 volúmenes de isopropanol (IPA).
8. Recuperar el HA derivatizado precipitado por filtración, centrifugación suave u otro medio adecuado y desechar el sobrenadante.
9. Presionar suavemente el HA/derivatizado recuperado para retirar el exceso de líquido.
10. Lavar el HA derivatizado precipitado en IPA al 60 %.
11. Retirar y desechar el fluido de lavado.
12. Presionar suavemente el HA derivatizado recuperado para retirar el exceso de líquido.
13. Pesar la cantidad de HA/derivatizado recuperado.
14. Disolver el HA/derivatizado recuperado en agua estéril hasta una concentración final de 2,5 % con respecto a la cantidad inicial de HA disuelto en la etapa 1.
15. Analizar la cantidad de derivatización de NHS (a partir del análisis de modificación química y de UV).
16. Analizar la concentración de HA derivatizado disuelto (a partir del análisis de modificación química y de UV o peso seco).
17. Ajustar la concentración de HA derivatizado a 2 % (20 mg/ml).
18. Esterilizar por filtración el HA derivatizado.

Nota: La etapa 7-14 debe llevarse a cabo lo más rápido posible, por ejemplo, deberían dejarse transcurrir menos de 30 min en total para estas etapas (aunque la disolución real del HA precipitado puede requerir más tiempo).

Procedimiento de preparación de matriz de proteínas reticuladas

1. Disolver proteína en PBS estéril hasta una concentración final de 100 mg/ml y filtrar de modo estéril.
2. Analizar la concentración de proteína (p. ej., a partir de análisis de UV).
3. Mezclar volúmenes iguales de HA derivatizado de 20 mg/ml con proteína de 100 mg/ml con mezclado/agitación a conciencia sin la introducción de burbujas de aire.
4. Dejar que se forme un gel durante 30-60 minutos (20-25 °C).
5. Llenar las jeringas.

Los siguientes son procedimientos habituales utilizados en los ejemplos que siguen.

## Ejemplo 1

Diagrama esquemático para la producción de un reticulante de ácido hialurónico soluble utilizando una carbodiimida y N-hidroxisuccinimida (NHS):

El Hyaluronic Acid (Ácido Hialurónico - HA) es un polisacárido que consiste en unidades de disacárido de ácido  $\beta$ -D-glucurónico-[1 $\rightarrow$ 3]- $\beta$ -D-N-acetil-glucosamina. La estructura ideal del HA se muestra en la figura 1.

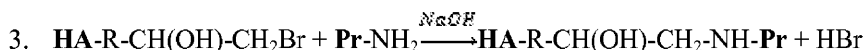
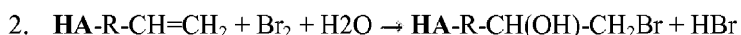
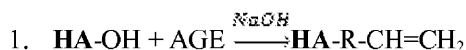
Como puede verse, el HA contiene un grupo carboxilo por unidad de disacárido, y este es el grupo funcional que se puede utilizar en el al menos uno de los enfoques de reticulación descritos en la presente memoria. En este enfoque se forma un enlace químico covalente entre el grupo carboxilo del HA y los grupos amino libres de la proteína. Esto puede realizarse haciendo reaccionar el HA con una carbodiimida tal como la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), formando un éster activo de o-acilisourea. Aunque este compuesto es reactivo con nucleófilos, tales como grupos amino primarios, también es inestable y se hidrolizará rápidamente en agua en ausencia de grupos reactivos adecuados. Por lo tanto, a menudo se prefiere formar un éster activo intermediario más estable del éster activo de o-acilisourea, lo que puede efectuarse mediante una reacción de condensación utilizando compuestos tales como N-hidroxisuccinimida (NHS) o sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS). Esto da lugar a la formación de HA activado con NHS, que puede reaccionar a continuación con grupos amino primarios procedentes de la proteína para formar enlaces amida muy estables. En la figura 2 se muestra un esquema de estas reacciones.

Una de las principales ventajas de este enfoque es que el HA se puede derivatizar antes de mezclarlo con la proteína, lo que limitará o evitará la presencia de reactivos de derivatización residuales en la formulación final. Los enfoques principales para retirar el exceso de reactivos son la precipitación con disolventes orgánicos miscibles en agua, tales como el isopropil alcohol (IPA) o el etanol, seguido de lavado con una mezcla de agua/disolvente o diafiltración utilizando una membrana semipermeable con un peso molecular de corte adecuado. Una vez que el HA derivatizado se ha purificado se puede disolver a continuación en agua o un tampón adecuado, tal como solución phosphate buffered saline (salina tamponada con fosfato - PBS) y mezclar a continuación con proteína para formar una formulación reticulada mediante reacción entre los ácidos carboxílicos activados con NHS del HA y los grupos amino procedentes de la proteína. En este enfoque, el HA se convierte efectivamente en el reticulante de la proteína. Se espera que las propiedades de la formulación resultante sean diferentes de una formulación donde la proteína es reticulada con un reticulante corto; o, donde el HA es reticulado por un reticulante corto en ausencia de proteína.

## Ejemplo de referencia 2

Diagrama esquemático para la producción de un reticulante de ácido hialurónico soluble utilizando el reactivo heterobifuncional alilglicidil éter (AGE):

Este enfoque se basa en la derivatización de Hyaluronic Acid (Ácido hialurónico - HA) con un reactivo heterobifuncional que hace posible el empleo de un enfoque de dos etapas para la reticulación de proteínas con HA. El método escogido en este ejemplo fue el uso de alilglicidil éter (AGE), donde la incorporación inicial de AGE se produce cuando el grupo oxirano reacciona con los grupos hidroxilo del HA en condiciones fuertemente alcalinas, formando un enlace éter estable. Los grupos alilo incorporados de ese modo pueden convertirse a continuación en halohidrininas mediante la reacción con un haluro, tal como bromo. Estas halohidrininas pueden reaccionar a continuación con proteína a través de grupos amino primarios formando enlaces de amina secundaria estables. La reacción entre halohidrininas y grupos amino primarios se produce más eficazmente a valores de pH altos, pero un cierto grado de reacción comenzará a producirse por encima de un pH de 8,5-9.



El esquema de reacción mostrado anteriormente para las proteínas de reticulación con HA. HA=ácido hialurónico, R = O-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>, AGE = alilglicidil éter, Pr = proteína.

## Ejemplo 3

Preparación de un reticulante de polisacárido A:

En este ejemplo, se mezclaron 5 ml de una solución de ácido hialurónico de bajo peso molecular al 1 %, 1 ml de H<sub>2</sub>O, 100 mg de NHS (Sigma) y 100 mg de EDC (Sigma) y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. El ácido hialurónico derivatizado se precipitó a continuación con dos volúmenes de IPA, se prensó brevemente para reducir el contenido de agua y disolvente del precipitado, se lavó con etanol al 66 % y a continuación se redisolvió en 4 ml de solución salina tamponada con fosfato (Sigma) a temperatura ambiente. El HA derivatizado se disolvió completamente en el transcurso de 1 hora. La

concentración del HA derivatizado se midió utilizando un analizador de humedad y a continuación se diluyó a una solución al 2 % antes de utilizar en la reticulación de proteínas. Todas las preparaciones fueron estériles y los experimentos se llevaron a cabo, en la medida de lo posible, en una campana de flujo laminar.

#### 5 Ejemplo 4

Preparación de un reticulante de polisacárido B:

10 En este ejemplo, se mezclaron 5 ml de una solución de carboximetilcelulosa al 1 %, 1 ml de H<sub>2</sub>O, 100 mg de NHS (Sigma) y 100 mg de EDC (Sigma) y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. La carboximetilcelulosa derivatizada se precipitó a continuación con dos volúmenes de IPA, se prensó brevemente para reducir el contenido de agua y disolvente del precipitado, se lavó con etanol al 66 % y a continuación se redisolvió en 4 ml de solución salina tamponada con fosfato (Sigma) a temperatura ambiente. Todas las preparaciones fueron estériles y los experimentos se llevaron a cabo, en la medida de lo posible, en una campana de flujo laminar.

#### 15 Ejemplo de referencia 5

Preparación de un reticulante de polisacárido C:

20 En este ejemplo, se mezclaron 4 ml de HA al 2 % con 0,5 ml de NaOH 10 M y 0,5 ml de AGE y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución se neutralizó a continuación con 1 ml de ácido acético 9M, se añadieron 40 mg de NaCl seguido de precipitación con 2 volúmenes de IPA. El precipitado se lavó con IPA al 60 %, se secó con papel de filtro y a continuación se redisolvió en 3 ml de agua. Se llevó a cabo a continuación la conversión de los grupos alilo incorporados con agua bromada (se añadieron 250 µl, pero la cantidad necesaria para la conversión completa era de entre 200 y 250 µl). Para eliminar el exceso de bromo, la solución se volvió a precipitar añadiendo 30 mg de NaCl seguido de 2 volúmenes de IPA. El precipitado se lavó con IPA al 60 %, se secó sobre un papel de filtro y a continuación se redisolvió en 2 ml de agua. Se utilizaron 0,5 ml de la solución para analizar la concentración final del HA derivatizado en un analizador de humedad y se determinó que el contenido en materia seca era de 2,59 %. El HA derivatizado se diluyó hasta una solución al 2 % antes de usarlo en la reticulación de proteínas.

#### 30 Ejemplo 6

Preparación de una formulación basada en proteína utilizando Tropoelastina rh 1:

35 En este ejemplo, se mezclaron 250 µl de una solución de tropoelastina hr de 200 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (Elastagen) con 250 µl de solución salina tamponada con fosfato seguido de la adición de 500 µl del reticulante de ácido hialurónico del ejemplo 3. La combinación se mezcló a conciencia y seguidamente se centrifugó brevemente para eliminar burbujas de aire. El material se dejó durante 30 min a temperatura ambiente para la formulación. A continuación, la formulación se introdujo en una jeringa estéril de 1 ml en una campana de flujo laminar. 40 Todas las formulaciones preparadas de este modo presentaron las propiedades de materiales firmes que eran extrudibles a través de agujas de calibre fino 31 G como hebras uniformes de 10-20 cm de longitud.

#### Ejemplo 7

45 Preparación de una formulación a base de proteínas utilizando albúmina de suero bovino (BSA):

En este ejemplo, se mezclaron 250 µl de una solución de BSA de 200 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (Sigma) con 250 µl de solución salina tamponada con fosfato seguido de la adición de 500 µl del reticulante de ácido hialurónico del ejemplo 3. La combinación se mezcló a conciencia y seguidamente se centrifugó brevemente para eliminar burbujas de aire. El material se dejó durante 30 min a temperatura ambiente para la formulación. La formulación preparada de este modo presentó las propiedades de un material firme que era extrudible a través de agujas de calibre fino 31 G como hebras uniformes de 10-20 cm de longitud.

#### 55 Ejemplo 8

Preparación de una formulación a base de proteínas utilizando rhHSA:

En este ejemplo, se mezcló una solución de 20 mg/ml de HSA recombinante (Sigma) en solución salina tamponada con fosfato (Sigma) con un volumen igual del reticulante de ácido hialurónico del ejemplo 3. La combinación se mezcló a conciencia y seguidamente se centrifugó brevemente para eliminar burbujas de aire. El material se dejó durante 30 min a temperatura ambiente para la formulación. Esto produjo una formulación de HSA incolora transparente reticulada blanda que era extrudible a través de agujas de calibre fino 31 G.

#### 65 Ejemplo 9

Preparación de una formulación a base de proteínas utilizando Tropoelastina rh 2:



5 En este ejemplo, se mezclaron 500 µl de una solución de tropoelastina rh de 100 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (Elastagen) con 500 µl de reticulante de ácido hialurónico al 2 % del ejemplo 5 a un pH de 8,5. La combinación se mezcló a conciencia y seguidamente se centrifugó brevemente para eliminar burbujas de aire. El material se dejó durante 12 h a temperatura ambiente para la formulación. La formulación producida era una formulación de matriz incolora transparente firme de tropoelastina reticulada con HA.

#### Ejemplo 10

#### 10 Evaluación del contenido monomérico en las formulaciones

En este ejemplo, se remojó una alícuota de la formulación producida en el ejemplo 6 en PBS y el sobrenadante resultante se analizó mediante SDS-PAGE (el gel resultante se ilustra en la figura 3).

#### 15 Carga: Formulación producida en el ejemplo 6, remojada en PBS

Franja M: Marcador.

#### 20 Franja A y B: Sobrenadante.

Franja TE: TE puro.

Como puede observarse a partir del gel, no se extrajo monómero de la preparación de HA-TE.

#### 25 Ejemplo 11

#### Evaluación de las propiedades reológicas de la formulación

30 En este ejemplo, se estudió el comportamiento reológico en los flujos de cizallamiento de la formulación producida en el ejemplo 6 utilizando un reómetro Haake RS150 utilizando una geometría de cono y placa. En el estudio, se utilizó un cono de titanio de 35 mm/1°, manteniendo la temperatura a 25 °C.

35 La respuesta de la formulación a un flujo de cizallamiento oscilante de pequeña amplitud, con una frecuencia angular variable, está dominada por el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) en el intervalo de frecuencias angulares de 0,1 a 100 rad/s. En este intervalo, el módulo de almacenamiento fue relativamente insensible a los cambios en la frecuencia angular. En flujo de cizallamiento constante, la deformación aumenta linealmente con la tensión hasta aproximadamente 200 Pa. Por encima de este valor, un pequeño cambio en la tensión aplicada dio lugar a un aumento significativo en la deformación. Cuando la viscosidad de cizallamiento se representó frente a la velocidad de cizallamiento el fluido mostró tener una viscosidad constante de alrededor de 260 Pa.s a velocidades de cizallamiento bajas. La viscosidad disminuyó sin embargo rápidamente al aumentar la velocidad de cizallamiento por encima de una velocidad de cizallamiento de aproximadamente 0,4/s.

45 Las propiedades reológicas de la formulación basada en proteínas producidas en el ejemplo 6 difieren de forma significativa con respecto a los polisacáridos no reticulados y con respecto a los productos de polisacárido reticulados con reticulantes cortos tales como BDDE que son micronizados a continuación para permitir la extrusión mediante aguja fina. Estos productos de polisacárido se comportan más como fluidos viscosos y tienen una contribución mayor a sus propiedades reológicas debidas al módulo de pérdida ( $G''$ ) para las mismas frecuencias examinadas. El valor relativamente constante del módulo complejo de la formulación producida en el ejemplo 6 proporciona un punto particular de diferencia con respecto a los productos basados en polisacáridos.

50

## REIVINDICACIONES

1. Una composición inyectable, que comprende al menos una matriz de proteínas reticuladas, en donde la al menos una matriz de proteínas reticuladas comprende:
  - i) entre 1-250 mg/ml de al menos un residuo de proteína derivado de al menos una proteína portadora de amina;
  - ii) al menos un residuo que contiene sacárido derivado de al menos una molécula de reticulación que contiene sacárido, que comprende uno o más grupos carboxilo; y
  - iii) al menos una reticulación intermolecular que comprende un enlace amida entre una amina del al menos un residuo de proteína y un grupo carboxilo de la al menos una molécula de reticulación que contiene sacárido;
 en donde el al menos un residuo de proteína es:
  - a) una proteína de longitud completa o una proteína de longitud sustancialmente completa; y
  - b) sustancialmente desprovista de reticulaciones intramoleculares.
2. Un método de preparación de una composición inyectable, que comprende al menos una matriz de proteínas reticuladas, en donde la al menos una matriz de proteínas reticuladas comprende:
  - i) al menos un residuo de proteína derivado de al menos una proteína portadora de amina;
  - ii) al menos un residuo que contiene sacárido derivado de al menos una molécula de reticulación que contiene sacárido que comprende uno o más grupos carboxilo; y
  - iii) al menos una reticulación intermolecular que comprende un enlace amida entre la amina de la al menos una proteína portadora de amina y el grupo carboxilo de la al menos una molécula de reticulación que contiene sacárido;
 en donde la reticulación comprende:
  - 1) modificar la al menos una molécula que contiene sacárido de modo que comprenda al menos un grupo químico reactivo;
  - 2) combinar la al menos una molécula que contiene sacárido modificada con la al menos una proteína portadora de amina, en donde la al menos una proteína portadora de amina comprende un grupo químico reactivo complementario al grupo reactivo en la al menos una molécula que contiene sacárido modificada; y
  - 3) formar la al menos una reticulación intermolecular entre la al menos una proteína portadora de amina y la al menos una molécula que contiene sacárido modificada.
3. La composición inyectable de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en donde la composición inyectable es extrudible a través de agujas de 18 G a 31 G a una longitud de entre aproximadamente 5 cm a aproximadamente 30 cm y la composición extrudida se mantiene entera sustancialmente sin soporte de superficie; y/o
 en donde la composición inyectable es extrudible a una longitud de entre 5 cm a 30 cm, de 10 cm a 20 cm; o de 15 cm a 30 cm sin soporte de superficie adicional cuando se extrude a través de una aguja de calibre fino y en donde la composición extrudida es sustancialmente uniforme y se mantiene sustancialmente entera.
4. La composición inyectable o el método de la reivindicación 3, en donde la composición inyectable mantiene una cohesividad suficiente después de la extrusión con aguja de modo que las hebras de la composición extrudida no se rompen durante la extrusión.
5. La composición inyectable de una o más de las reivindicaciones anteriores o el método de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el al menos un residuo de proteína está desprovisto de reticulaciones intramoleculares.
6. La composición inyectable de una o más de las reivindicaciones anteriores o el método de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la composición inyectable permite que el al menos un residuo de proteína mantenga su longitud completa, o su longitud sustancialmente completa, y en donde la composición inyectable es inyectable con aguja, mantiene una estructura uniforme, y está suficientemente reticulada para ralentizar la resorción in vivo de la composición inyectable,

en donde el al menos un residuo de proteína es una proteína de longitud sustancialmente completa, y/o en donde la composición inyectable es compatible con los tejidos, mejora el crecimiento de los tejidos, mejora el nuevo crecimiento de los tejidos, o combinaciones de los mismos.

- 5 7. La composición inyectable de una o más de las reivindicaciones anteriores o el método de las reivindicaciones 2 a 6, en donde el al menos un residuo que contiene sacárido tiene una o más de las siguientes propiedades: sustancialmente biodisponible, sustancialmente biodegradable, sustancialmente bioabsorbible, o sustancialmente biorresorbible.
- 10 8. La composición inyectable de una o más de las reivindicaciones anteriores o el método de las reivindicaciones 2 a 7, en donde el al menos un residuo polisacárido se deriva o comprende el residuo de ácido hialurónico, un derivado de celulosa, carboxicelulosa, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxi-propilcelulosacarboximetil amilosa, goma xantano, goma guar,  $\alpha$ -glucano,  $\beta$ -glucano,  $\beta$ -1,4-glucano,  $\beta$ -1,3-glucano, alginatos, carboximetildextrano, un derivado de glicosaminoglicano, condroitín-6-sulfato, sulfato de dermatina, heparina, sulfato de heparina, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poli(láctico-co-glicólico), fosfato tricálcico, 1-hidroxiapatita, sales, derivados, y/o combinaciones farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 15 9. La composición inyectable o el método de la reivindicación 8, en donde el al menos un residuo polisacárido es ácido hialurónico.
- 20 10. La composición inyectable de una o más de las reivindicaciones anteriores o el método de las reivindicaciones 2 a 9, en donde el al menos un residuo de proteína se deriva o comprende el residuo de tropoelastina, elastina, albúmina, colágeno, monómeros de colágeno, inmunoglobulinas, insulina, derivados de, o combinaciones de los mismos y/o  
en donde la cantidad del al menos un residuo de proteína es de entre 1-200 mg/ml, 5-30 mg/ml, 20-100 mg/ml, 50-200 mg/ml, 25-80 mg/ml, 30-60 mg/ml, 40-70 mg/ml, o 25-65 mg/ml.
- 25 11. La composición inyectable o el método de la reivindicación 10, en donde el al menos un residuo de proteína es tropoelastina.
- 30 12. La composición inyectable de una o más de las reivindicaciones anteriores o el método de las reivindicaciones 2 a 11, en donde la cantidad del al menos un residuo que contiene sacárido es de entre 1-30 mg/ml; y en donde la cantidad del al menos un residuo de proteína es de entre aproximadamente 25-50 mg/ml.
- 35 13. La composición inyectable de una o más de las reivindicaciones anteriores o el método de las reivindicaciones 2 a 12, en donde la al menos una matriz de proteínas reticuladas se deriva o comprende el residuo de una proteína sintética sustancialmente idéntica a una proteína humana natural; y/o  
en donde la al menos una matriz de proteínas reticuladas se prepara a partir de al menos una molécula de reticulación que contiene sacárido que comprende al menos 5 % de carboxilo activado, carboxilo modificado o combinaciones de los mismos.
- 40 14. La composición inyectable de una o más de las reivindicaciones anteriores o el método de las reivindicaciones 2 a 13, en donde el número de unidades de proteína no incorporadas en la al menos una matriz de proteínas reticuladas y que se mantienen no unidas puede ser de al menos 1 %, 3 %, 5 %, o 7 %.
- 45 15. El método de las reivindicaciones 2 a 14, en donde la al menos molécula que contiene sacárido modificada permanece soluble o sustancialmente soluble en agua o tampón fisiológico.
- 50 16. La composición inyectable de una o más de las reivindicaciones anteriores o el método de las reivindicaciones 2 a 15, en donde la composición inyectable o la composición inyectable preparada se utiliza para dar volumen, aumentar tejidos o combinaciones de los mismos en al menos uno de los siguientes campos: medicina humana o veterinaria; cirugía; cirugía reconstructiva; cirugía estética; estética; aumento del volumen de los tejidos; cirugía dermatológica; cirugía ocular; reumatología; farmacología; en el campo de la cosmética; hemorragia derivada en cirugía general; reconstrucción de nervios y vasos en cirugía reconstructiva, neurocirugía; cirugía plástica; trasplantes o injertos de piel de anclaje, vasculares, o de cartílago en cirugía ortopédica; tratamiento de la osteoartritis de la rodilla; cirugía vascular; como vehículos para el suministro de células o moléculas bioactivas, tales como factores de crecimiento para estimular la reparación focalizada; suministro local de factores de crecimiento en combinación con las composiciones de matriz de proteínas reticuladas para facilitar la curación de heridas y la regeneración de tejidos o favorecer la formación de hueso; estimular la reparación de cartílago en procedimientos ortopédicos; tratar afecciones debidas a heridas patológicas, tales como úlceras crónicas; servir como estructura base para generar tejidos artificiales mediante la proliferación de células autólogas en cultivo; para el aumento de tejido en cirugía plástica, tal como para rellenar pliegues dérmicos o para la reconstrucción labial;
- 55 60 65

para el suplemento de una cavidad corporal o de un déficit; para medicina estética; tratamiento ortopédico; o restauración de volumen efundido durante cirugía, tal como durante la cirugía ocular.

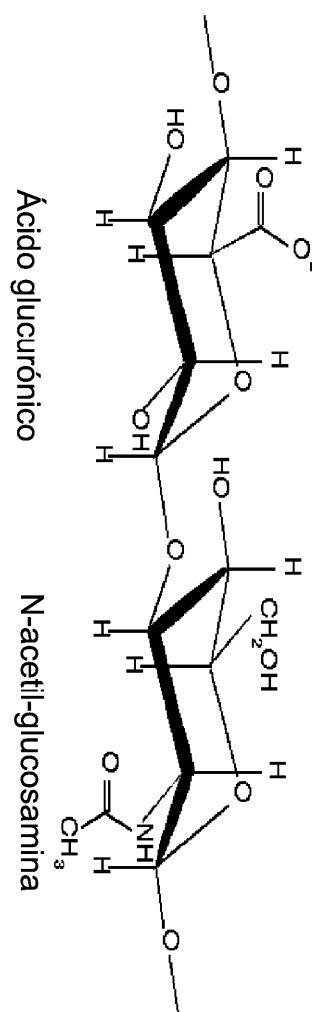


FIGURA 1

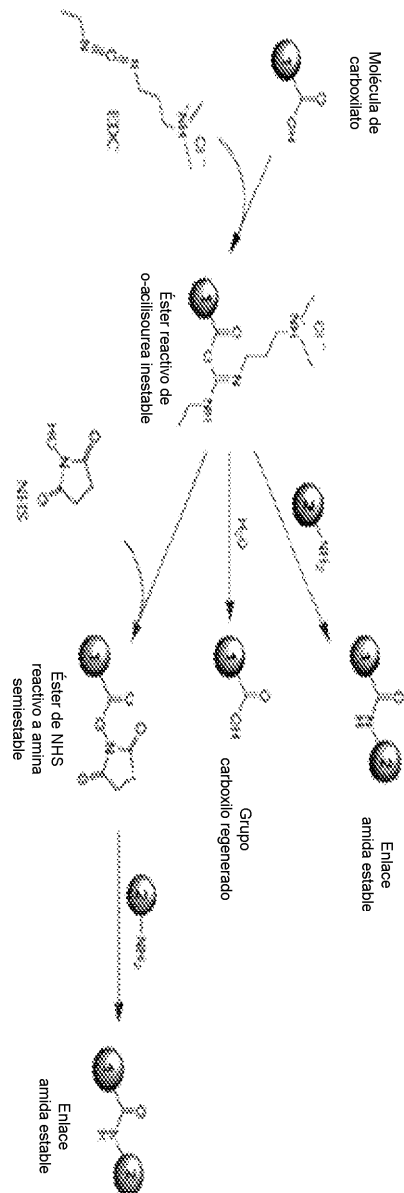


FIGURA 2

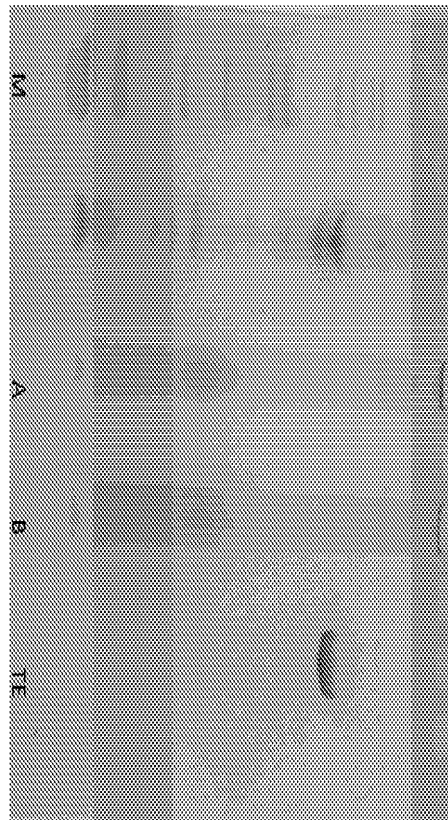


FIGURA 3